

DIE PHARMAKOKINETIK EINIGER KLINISCH WICHTIGER PYRAZOLDERIVATE

Antipyrin, Aminopyrin, Phenylbutazon und Oxyphenbutazon

von

Winfried Stelzer

aus

Aachen

1973

1974 № 63



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548406_0002

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
em. Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

**DIE PHARMAKOKINETIK EINIGER KLINISCH
WICHTIGER PYRAZOLDERIVATE**
Antipyrin, Aminopyrin, Phenylbutazon und Oxyphenbutazon

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Winfried Stelzer
aus
Aachen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. L. Demling
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 12. 1973

INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

I. EINLEITUNG

Die Bedeutung der Sprache, ihre Aufgaben
 und ihre Stellung im menschlichen
 Leben

II. GRAMMATIKALISCHES

1. Die Sprache des Menschen

a) Sprachlaute

b) Wortbildung und Wortarten

2. Satzarten

a) Aussagesätze

b) Fragesätze

c) Imperativsätze

d) Ausrufesätze

Meiner lieben Mutter gewidmet

e) Nebensätze

f) Satzverbindungen

3. Die Satzglieder

a) Subjekt

b) Prädikat

c) Objekt

d) Adverbialbestimmung

e) Apposition

f) Interjektion

g) Satzverbindungen

h) Satzglieder

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A) EINLEITUNG	8
Die Entwicklung der Pyrazole, ihre Hauptwirkungen und ihre heutige pharmakologische Bedeutung	8
B) PROBLEMSTELLUNG UND AUSWAHL DER BESPROCHENEN MEDIKAMENTE	16
C) ZUR CHEMIE DER PYRAZOLE	17
1. <u>Systematik</u>	17
2. <u>Physikalisch-chemische Eigenschaften</u>	18
D) RESORPTION	28
1. <u>Resorptionsmechanismen</u>	28
2. <u>Zeitlicher Ablauf und Vollständigkeit der Resorption nach peroraler Verabreichung von Pyrazolderivaten</u>	29
3. <u>Orte maximaler Resorption</u>	34
4. <u>Untersuchungen zur Resorption bei intramuskulärer und rektaler Applikation</u>	34
E) BLUT- UND ORGANWERTE (VERTEILUNG)	36
1. <u>Prinzipien der Verteilung</u>	36
2. <u>Verteilung von Phenylbutazon</u>	36
a) Proteinbindung und Plasmawerte	36
b) Organwerte bei Mensch und Tier	38
c) Diskussion der gefundenen Werte	41
d) Pharmakologische Bedeutung der Proteinbindung des Phenylbutazon	41

	Seite
3. <u>Verteilung von Oxyphenbutazon</u>	42
a) Proteinbindung und Plasmawerte	42
b) Oxyphenbutazon in Körperflüssigkeiten	42
c) Kompetitive Wechselwirkungen zwischen Oxyphenbutazon und Methandrostenolon	42
4. <u>Verteilung von Aminopyrin</u>	42
5. <u>Verteilung von Antipyrin und seine Anwendung bei der Bestimmung von Körperwasservolumina</u>	44
F) METABOLISMUS UND AUSSCHIEDUNG (ELIMINATION)	47
1. Überblick über die metabolismusspezifischen Strukturen und die bisher bekannten Abbaureaktionen für Arzneimittel, sowie die Bedeutung von Metabolismus und Ausscheidung für den gesamten Organismus	47
2. Elimination von Phenylbutazon und Oxyphenbutazon	48
a) <u>Phenylbutazonmetaboliten</u>	49
α) Struktur	49
β) Chemische Eigenschaften	50
γ) Pharmakokinetik und pharmakologische Eigenschaften	50
δ) Weitere, noch nicht identifizierte Metaboliten	52
ε) Halbwertszeiten und Metabolismusraten	53
3. Spezielle Angaben über den Arzneimittelmetabolismus, dargestellt anhand von Untersuchungen mit Phenylbutazon und Oxyphenbutazon	54

	Seite
a) <u>Unterschiedliche Metabolismusraten zwischen verschiedenen Arten</u>	54
b) <u>Unterschiedliche Metabolismusraten innerhalb der gleichen Art</u>	55
c) <u>Enzyminduktion</u>	57
d) <u>Einfluß von Lebererkrankungen</u>	57
e) <u>genetischer Einfluß</u>	59
4. <u>Elimination von Aminopyrin</u>	59
a) Aminopyrinmetaboliten; Erstbeschreiber, Struktur und Pharmakokinetik	59
α) Rubazonsäure	59
β) 4-Amino-antipyrin und N-acetyl-4-aminoantipyrin	60
γ) Antipyrilharnstoff	62
δ) Konjugiertes 4-Hydroxyantipyrin	62
ε) 4-Methylaminoantipyrin und 4-Methylacetylaminoantipyrin	63
ζ) Hinweise auf noch nicht identifi- zierte Aminopyrin-Metaboliten und Methylrubazonsäure	63
η) Diketopyrazolin	64
θ) Acetyl-amino-3-methyl-1-phenyl- pyrazolon(5)	65
ι) 4-Dimethylamino-3-hydroxymethyl- 2-methyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on und 4-Dimethylamino-2-methyl-5-oxo-1- phenyl-3-pyrazolin-3-carboxylsäure	67

b) Metabolismus des Aminopyrin aufgrund der bisher im Harn nachgewiesenen Metaboliten; eine Übersicht	68
c) Halbwertszeiten und Metabolismusraten des Aminopyrin	69
d) Zur Pharmakologie der Pyramidon-metaboliten	70
e) Untersuchungen zum Arzneimittelmetabolismus mit Hilfe von Aminopyrin	71
α) Tierversuche	71
β) In vitro Untersuchungen	74
5. <u>Elimination von Antipyrin</u>	78
a) Antipyrinmetaboliten; Erstbeschreiber, Struktur und Pharmakokinetik	78
α) Hydroxyantipyrinkonjugat	79
β) 3-Hydroxymethyl-2-methyl- 1-phenyl-3-pyrazolin-5-on	81
γ) 1-Phenyl-3-methyl-3-pyrazolin- 5-on-konjugat	82
δ) Diketopyrazolin	82
b) Metabolismus des Antipyrin aufgrund der bisher im Harn nachgewiesenen Metaboliten; eine Übersicht	84
c) Zur Pharmakologie der Antipyrin-metaboliten	85
d) Antipyrin-Halbwertszeit	85

	Seite
e) Untersuchungen zum Arzneimittel- metabolismus anhand experimenteller Studien der Antipyrin-Halbwertszeit beim Menschen	85
G) NACHWEIS- UND BESTIMMUNGSMETHODEN IN BIOLOGISCHEM MATERIAL	88
H) ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION	130
I) LITERATURVERZEICHNIS	135

A) EINLEITUNG

Die Entwicklung der Pyrazole, ihre Hauptwirkungen und ihre heutige pharmakologische Bedeutung

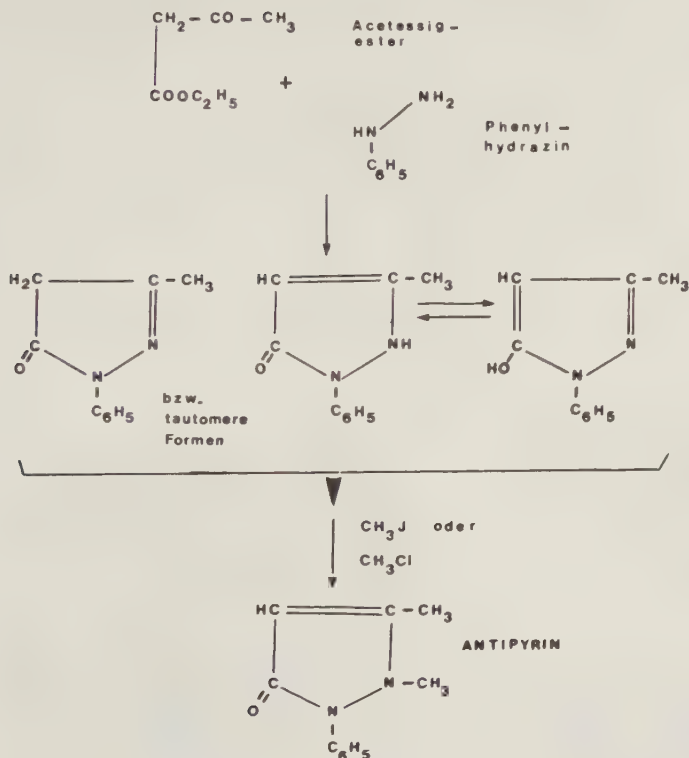
Im Jahre 1883 setzte Knorr, ein Schüler E. Fischers, Phenylhydrazin mit Acetessigester um. Auf diesem Weg wollte er zu chininähnlichen Chinolinderivaten kommen (Knorr 1884). Die für das Umsetzungsprodukt zunächst angenommene Struktur erwies sich zwar später als falsch, doch rückten besondere Eigenschaften den gefundenen Stoff bald in den Blickpunkt des pharmakologischen Interesses.

Die Substanz und verschiedene ihrer Derivate erwiesen sich als analgetisch und besonders auch antipyretisch hochwirksam. Das Methylierungsprodukt wurde 1885 als Antipyrin^R in die Therapie eingeführt. In Abb. 1 findet man einen schematischen Überblick über die Darstellung von Antipyrin, sowie die gebräuchlichsten internationalen Synonyma. Charakteristisch für das neue Medikament war sein Pyrazolonkern, ein heterozyklischer Fünfring, den es in der belebten Natur nicht gibt.

Der therapeutische Erfolg des Antipyrin^R (internat. Bez.: Phenazon) regte zur Erprobung weiterer Pyrazolonderivate an; aufgrund solcher Untersuchungen konnte 1896 ein weiteres Medikament in den Arzneimittelschatz eingeführt werden, das Dimethylaminophenazon (Pyramidon^R), welches wegen seiner sicheren analgetischen Wirkung auch heute noch zu den Standardpräparaten der Pharmakologie zählt (Abb. 2).

Abb. 1

Antipyrin Struktur, Darstellung und Synonyma



Systematischer Name

1-Phenyl-2,3-dimethyl-
3-pyrazolin-5-on=1,5-
Dimethyl-2-phenyl-3-
pyrazolon

Summenformel

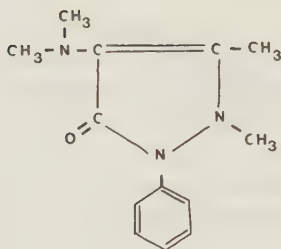
C₁₁H₁₂N₂O

Synonyma

Analgesin, Analgina, Anodina, Anody-
nin, Antiphlogin, Antipirina, Anti-
pyrin, Apirelina, Apiretina, Azo-
phen, Dimethyloxychinizin, Fena-
zone, Fenilazone, Itamidina,
Methozin, Oxydimethylchinazin,
Parodina, Parodyne, Phenazon (e),
Phenylon, Pyralon, Pyrazoline,
Pyrazophyl, Pyrodin, Sedatin

Abb. 2

Aminopyrin
Struktur und Synonyma



Systematischer Name

4-Dimethylamino-2,3-dimethyl-1-phenylpyrazolin-5-on

Summenformel

$C_{13}H_{17}N_3O$

Synonyma

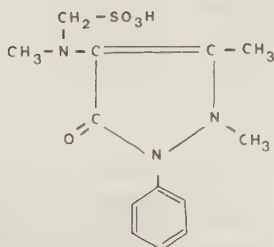
Alamidon, Amidazophen, Amido-febrin(e), Amido-Intracutan, Amidophen, Amidophenazon *, Amidopirina, Amidopyrazoline, Amidopyrin, Amidozon, Ainalgésine, Aminophenazon *, Aminopirina, Aminopyrin, Aminopyrol, Anafebrine, Aneuxol Anoxol, "Antipyreticum", Brufaneuxol, Diamin, "Grossmann", Dimametten, Dimaphenon, Dimapyrin, Dimethylaminoantipyrin, Dimethylaminophenazon, Dimopyran, Dipyrin, Ensomidon, Febrinine, Febron "Daiichi", Fondonal, Goamidon, Grocoril, Itamidon(e), Kofamin, Medufen, Metrodon, Nervopyron, Novamidon Permidan, Phenopyral, Pignadon, Piramidone, Piridol, Polinalin, Pyracyl, Pyradon(e), Pyramidon, Pyramin, Pyran, Pyrazon, Pyrazorin, Schmerztabletten "Rieswerke", Sipafix, Stellamidon, Venopyracylum

* Diese Bezeichnungen sind mißverständlich, da Verwechslung mit 4-Aminoantipyrin (= "4-Aminophenazon"), einem Metaboliten des Pyramidon, möglich.

Weitere Versuche zielten darauf ab, besser wasserlösliche Aminopyrinalanaloge zu entwickeln und dadurch die parenterale Applikation zu ermöglichen. Ergebnisse dieser Bemühungen waren Präparate vom Amizol- und Metamizoltyp (Melubrin^R, Novalgin^R) (Abb. 3), (Abb. 3a).

Abb. 3

Metamizol
Struktur und Synonyma



Systematischer Name

N-Methyl-N-(2.3-dimethyl-5-oxo-1-phenyl-3-pyrazolin-4-yl)-aminomethansulfonsäure=2.3-Dimethyl-4-methylamino-1-phenyl-5-pyrazolon-N-methansulfonsäure

Summenformel

$C_{13}H_{17}N_3O_4S$

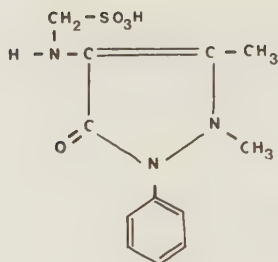
Synonyma

Alginodia, Algocalmin, Algotpyrin, Aminopirina solfonato, Analgetin, Analgin, Barone, Bonpyrin, Diprone, Dipyrone, Duralgina, Conmel, Febron, "Dr. Janka", Fevonil, Gifaril, Key-Pyrone, Metamizol, Metapyrin, Methampyrone, Methylmelubrin, Metilon, Minalgin, Nadalgine, Narone, Nartate, Natrium noraminophenazonmethansulfonicum, Neo-Melubrina, Neo-Pyrazonal, Nevralgina, Noramidopyriniummethansulfonatnatrium, Novalcina, Novaldin, Novalgetol, Novalgin,

Novamidazophen, Novaminsulfon, Novapyrin, Noveltext, Novemina, Novil, Pantalgan, Paralgin, Pydirone, Pyral, Pyralgin, Pyralgin, Pyretin, Pyridone, Pyrisan, Sulfonovin, Sulpyrin, Zymapiril

Abb. 3a

Amizol
Struktur und Synonyma



Systematischer Name

2,3-Dimethyl-5-oxo-1-phenyl-3-pyrazolin-4-ylaminomethansulfonsäure = 4-Amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-5-pyrazolon-N-methansulfonsäure

Synonyma

Amizol, Melaminsulfon, Melubrin, Pyrazogin, Sulfoamidopyrinnatrium, Sulfamipyrene, Sulphamidopyrin-Natrium

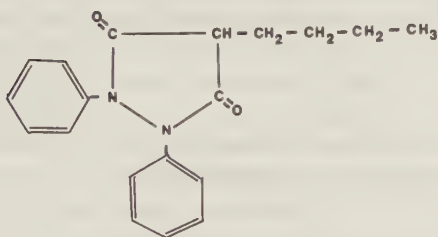
Summenformel

$C_{12}H_{15}N_3O_4S$

Unerwartet neue Aktualität gewannen die Pyrazole im Jahr 1949 durch Untersuchungen von Wilhelmi. Er suchte für Pyramidon^R einen Lösungsvermittler, der gleichzeitig dessen Wirkung unterstützen sollte. Hierbei stieß er auf Phenylbutazon (Abb. 4), das 1946 erstmals von Stenzl synthetisiert - bei seiner nun folgenden klinischen Erprobung einen eindrucksvollen antiinflammatorischen Effekt auf alle Entzündungen zeigte, insbesondere auch auf solche rheumati-

scher Genese. Dadurch trat seine Funktion als Lösungsvermittler bald in den Hintergrund.

Abb. 4 Phenylbutazon
Struktur und Synonyma



Systematischer Name

4-Butyl-1,2-diphenylpyrazolidin-3,5-dion=3,5-Dioxo-1,2-diphenyl-4-n-butylpyrazolidin

Synonyma

Arthrizon, Artrizin, Artrizone, Artropan, Azobutil, B.T.Z., "Butadion", Butadiona, Butagesic, Butalidon, Butaphen, "Marois", Butapirazol, Butartril, Butartrina, Butazina, Butazolidin(e), Butidiona, Butiwas-simple, Butone, Butylpyrin, Buzon, Dioxsidone, Diczol, Diphebuzol, Diphenylbutazon, Ecobutazone, Eributazone, Febuzina, Fenartril, Fenibutol, Fenilbutazona, Fenilbutina, Fenylbutazon, G 13871, Intrabutazone, Ipsoflame, Kadol, Malgesic, Nadozone, Phebuzine, Phenbutazol, Phenopyrine, Phenylbutazon, Phenyl-Mobuzon, Pirarremol-B, Pyrabutol, Reudo(x), Reumasyll, Reumuzol, Reupolar, Shigrocin, Ticinil "de Angeli"

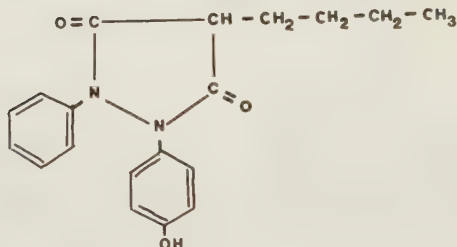
Summenformel

$C_{19}H_{20}N_2O_2$

Ein Metabolit des Phenylbutazon - bis auf eine in p-Stellung befindliche phenolische OH-Gruppe mit seinem Ausgangsprodukt identisch - zeigte ein ähnliches Wirkungsspektrum wie seine Muttersubstanz, bei allerdings wesentlich schwächer ausgeprägter analgetischer Komponente. Als neues, wertvolles Präparat wurde die Verbindung unter dem Namen Tanderil^R (internat. Bez.: Oxyphenbutazon) (Abb. 5) in den Handel gebracht.

Abb. 5

Oxyphenbutazon Struktur und Synonyma



Systematischer Name

4-n-Butyl-1-(p-hydroxyphenyl)-2-phenylpyrazolidin-3,5-dion

Summenformel

C₁₉H₂₀N₂O₃

Synonyma

Artroflog, Butaflogin, Butapiro-
ne, Butilene, Crovaril, Etrozoli-
dina, Flamaril, Flohene, Flogistin,
Flogitolo, Flogodin, Flogostop,
Flopirina, Frabel, G 272o2, Hydro-
xyphenylbutazon, Idrobutazina,
Iridil, Isobutil, Neo-Farmadol,
Neofen, Offitrit, Oxazolidin-Geigy,
Oxi-Fenibutol, Oxiphenbutazonum,
Oxyphenbutazon, Pirabutina, Pira-
flogin, Poliflogil, Tandearil, Tan-
deral, Delidal, Validil,
Visubutina

Eine Reihe weiterer Pyrazolderivate zeigt im Vergleich zu den bisher besprochenen keine wesentlichen Vorteile, tritt aber in der Häufigkeit ihrer Anwendung deutlich hinter jenen zurück.

Insgesamt gesehen scheint die Entwicklung der Pyrazole jetzt zu einem Abschluß gekommen zu sein.

Die im Verlauf von Jahrzehnten erprobte, sichere und prompte Wirksamkeit der Pyrazolone, der in Kombination mit anderen Antirheumatika bisher unübertroffene therapeutische Erfolg der Pyrazolidine und nicht zuletzt die große Zahl der mit den Medikamenten beider Gruppen behandelbaren Kranken sind Grundlage für die häufige und bevorzugte Anwendung, die die Pyrazole heute in der gesamten Welt finden.

B) PROBLEMSTELLUNG UND AUSWAHL DER BESPROCHENEN MEDIKAMENTE

Pyrazolone zählen mit zu den ersten synthetischen Arzneimitteln, die im freien Handel erhältlich waren. Die seit dieser Zeit durchgeführten experimentellen Untersuchungen finden ihren sichtbaren Ausdruck in einer für den Einzelnen kaum mehr überschaubaren, noch weitgehend ungeordneten Literatur wechselnder Qualifikation.

Als Beitrag zu einer kritischen Bestandsaufnahme stellt die vorliegende Arbeit die zur Pharmakokinetik der Pyrazole veröffentlichten Einzelbeobachtungen zusammen und ordnet sie in ihre Grundzusammenhänge ein, soweit diese heute bekannt sind.

Die Vielzahl der therapeutisch verwendeten Pyrazolverbindungen macht eine Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit zu erörternden Medikamente unumgänglich. Sie beschränkt sich daher im wesentlichen auf je zwei Pyrazolone und Pyrazolidine:

Antipyrin und Aminopyrin, sowie Phenylbutazon und Oxyphenbutazon.

Deren weite Verbreitung und häufige Anwendung ist in nahezu idealer Weise mit der Möglichkeit verknüpft, anhand der Originalliteratur pharmakokinetische Mechanismen und Problemstellungen aufzuzeigen und verständlich zu machen.

In einem Anhangsteil werden die Nachweismethoden für die besprochenen Medikamente kurz zusammengefaßt und erörtert.

C) Zur Chemie der Pyrazole

1. Systematik

Analog zu dem seiner Struktur nach ähnlichen Pyrrol schlug Knorr für den von ihm synthetisierten Heterocyklen den Namen Pyrazol vor.

Abb. 6 Pyrrol

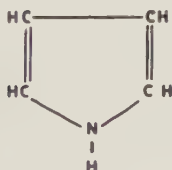
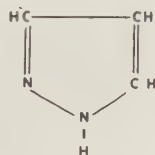


Abb. 7 Pyrazol



Dieser geht durch sukzessive Absättigung der Doppelbindungen zunächst in Pyrazolin und schließlich in Pyrazolidin über

Abb. 8 Pyrazolin

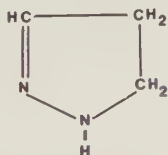
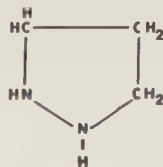
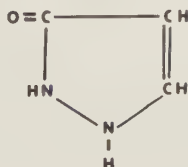


Abb. 9 Pyrazolidin



Gemeinsamer Grundkörper des Aminopyrin und Antipyrin ist demnach das 3-Pyrazolin-5-on, kurz, aber systematisch nicht ganz korrekt, als Pyrazolon bezeichnet.

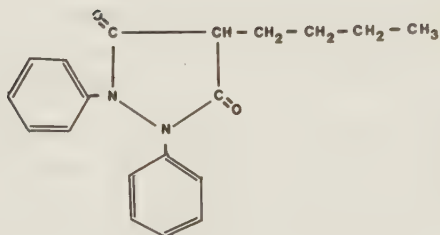
Abb. 10



3-Pyrazolin-5-on
= Pyrazolon

2. Physikalisch-chemische Eigenschaften

Abb. 11 Phenylbutazon



4n-Butyl-1,2-diphenylpyrazolidin-3,5-dion

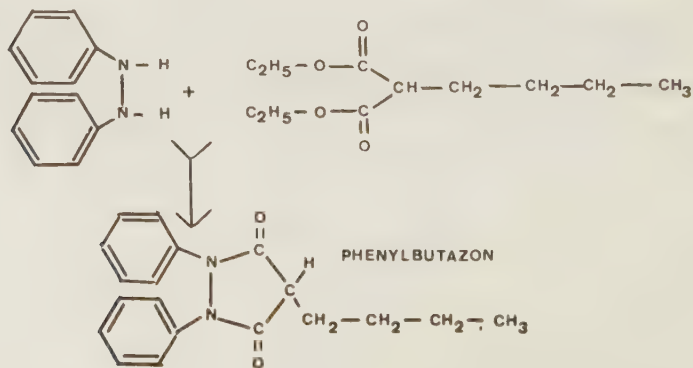
4n-Butyl-3,5-dioxo-1,2-diphenylpyrazolidin

$C_{19}H_{20}N_2O_2$

Molekulargewicht 308,4

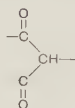
Phenylbutazon kann großtechnisch durch die Kondensation von Hydrazobenzol mit n-Butylmalonsäurediäthylester hergestellt werden (s. Abb. 12).

Abb. 12 HYDRAZO - BENZOL + n-BUTYLMALONSÄURE - DIÄTHYLESTER



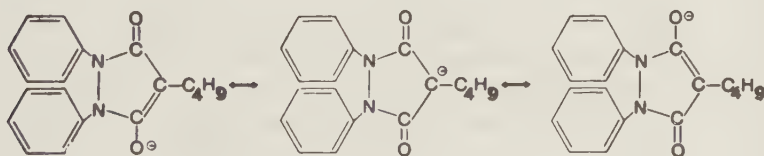
Folgende Atomgruppierung (Abb. 13) ist für den sauren Charakter des Gesamtmoleküls verantwortlich:

Abb. 13



Die beiden in enger Nachbarschaft stehenden Carbonylgruppen polarisieren stark die Bindung des C_4 -gebundenen Wasserstoffs, sodaß dieser leicht addissoziiert. Mesomeriestabilisiert bleibt ein negativ geladenes Enolation zurück, das als Zwischenzustand der folgenden Grenzformeln zu betrachten ist:

Abb. 14



Die Löslichkeitsveränderungen bei ansteigendem pH (Tab. 1) und die elektrometrische Titrationskurve (Abb. 15) lassen den Schluß zu, daß Phenylbutazon beim pH-Wert des Blutes in seiner Enolatform vorliegt.

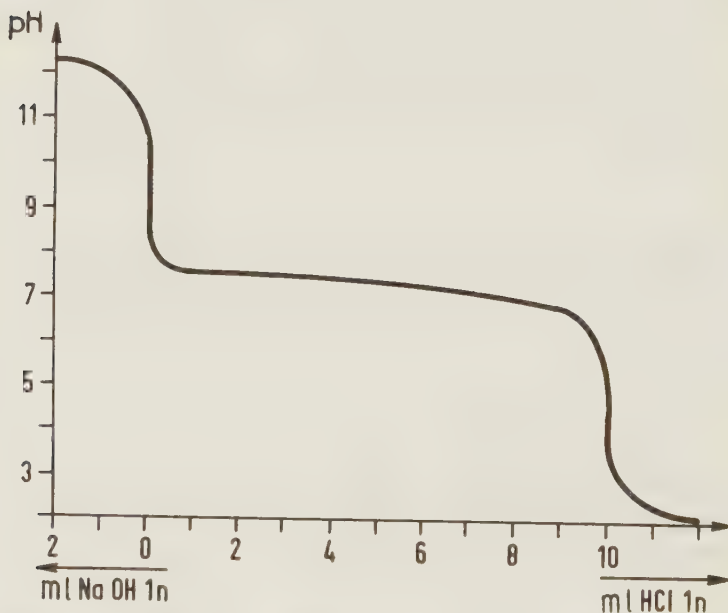
Tab. 1

Löslichkeit von Butazolidin bei verschiedenem pH-Wert

Lösungsmittel	pH	Löslichkeit *)
Phosphatpuffer m/15	7,0	188 mg%
Phosphatpuffer m/15	6,0	34,5 mg%
Acetatessigsäurepuffer m/10	4,7	3,6 mg%
Acetatessigsäurepuffer m/10	3,5	1,9 mg%
Destilliertes Wasser		1,5 mg%

*) bei 20° C in 100 ml (nach von Rechenberg 1961)

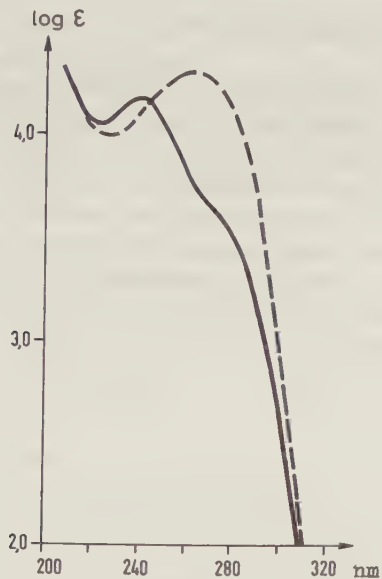
Abb. 15



Elektrometrische Titration von 0,01 Mol. Phenylbutazon-Natrium (in 100 ml Wasser) mit 1n HCl bzw. 1n NaOH (nach von Rechenberg 1961)

Dicarbonyl- und Enolform zeigen ein leicht divergierendes UV-Absorptionsspektrogramm (Abb. 16)

Abb. 16



UV-Spektren von
Butazolidin

(nach von Rechen-
berg 1961)

———— in schwach saurem Methanol

----- in verdünnter Lauge

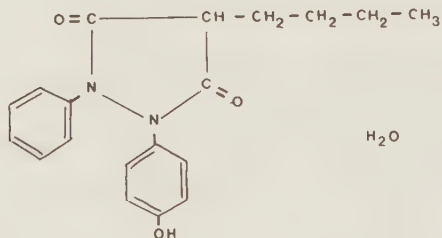
Abb. 15, 16 und Tab. 1 nach
H. K. v. Rechenberg und Mitarbeiter
"Butazolidin"
2. Auflage (1961)
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Dementsprechende Unterschiede zeigen sich auch in den IR-Spektren beider Formen.

Butazolidin-Dragees und -Suppositorien enthalten Phenylbutazon in der Dicarboxylform. Es ist ein feines, weißes, kristallines Pulver, nahezu geruchfrei; es hat einen leicht bitteren Nachgeschmack. Schmelzpunkt: $104,5^{\circ}\text{C}$ - 106°C (korr. Kapillare), 108°C (Kofler Bank). Es ist sehr gut löslich in Chloroform und Äther, löslich in Äthanol, Benzol und Methanol, weniger gut löslich in Isobutanol. Prüfung auf Identität und Reinheit s. British Pharmacopea 1963 und Breugelmans 1956.

Oxyphenbutazon

Abb. 17



1-Phenyl-2-(p-hydroxyphenyl)-3,5-dioxo-4-n-butyl-pyrazolidin-monohydrat

$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$

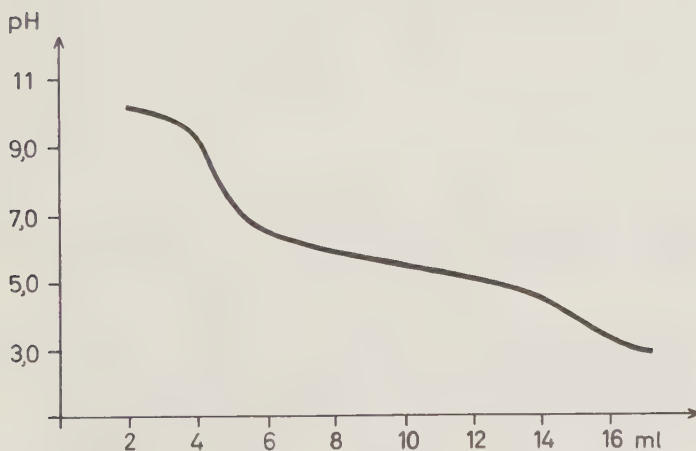
Molekulargewicht 342,4

Oxyphenbutazon ist ein weißes, kristallines Pulver, geruchlos oder nahezu geruchlos, von bitterem Geschmack, praktisch unlöslich in Wasser, bei 20°C löslich in 3 Teilen 95-prozentigem Alkohol, 20 Teilen Chloroform und in 6 Teilen Aceton.

Außerdem geht es im alkalischen Milieu in Lösung. Sein Schmelzpunkt liegt bei 124 - 126° C.

Erstmals synthetisiert wurde es 1957 durch Pfister und Häfliger. Die Strukturverwandtschaft mit Phenylbutazon zeigt sich deutlich in seinem chemischen Verhalten. Elektrometrische Titration und Löslichkeit bei verschiedenem pH zeigen klar den Übergang von der Dicarbonyl- in die Enolatform. Der pH-Übergangsbereich ist breiter als beim Phenylbutazon (Abb. 18, Tab. 2).

Abb. 18



Elektrometrische Titration von Oxyphenbutazon. 0,001 Mol Oxyphenbutazon wurden mit 0,0015 Mol NaOH zusammengegeben, mit 35 %igem Äthanol auf 100 ml aufgefüllt und mit n-HCl titriert.

Tab. 2

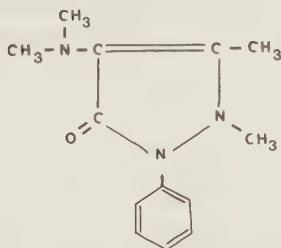
Löslichkeit von Oxyphenbutazon bei verschiedenem pH-Wert

Lösungsmittel	pH	Löslichkeit	+)
Phosphatpuffer m/15	7,0	195	mg%
Phosphatpuffer m/15	6,0	66	mg%
Acetatessigsäurepuffer m/10	4,7	13,2	mg%
Acetatessigsäurepuffer m/10	4,1	9,6	mg%
Acetatessigsäurepuffer m/10	3,5	8,1	mg%
Destilliertes Wasser		13,9	mg%

+) bei 20 °C in 100 ml

Aminopyrin

Abb. 19



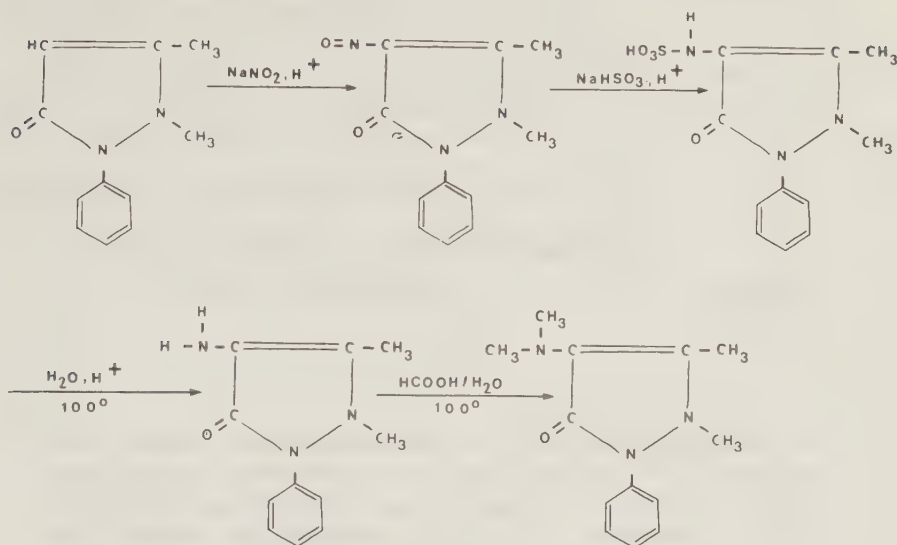
4-Dimethylamino-1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-pyrazolin

$C_{13}H_{17}N_3O$

Molekulargewicht 231,3

Zur Darstellung von Aminopyrin geht man vom Phenazon aus. Die Elektrophilie der C_4 -Wasserstoffbindung des Phenazon erlaubt in schwefelsaurer Lösung die Umsetzung mit $NaNO_2$ zu 4-Nitroso-antipyrin. Dieses geht durch stufenweise Reduktion mit $NaHSO_3$ und überschüssiger Schwefelsäure in 4-Amino-antipyrin über, welches dann zum Endprodukt methyliert werden kann. (Abb. 20)

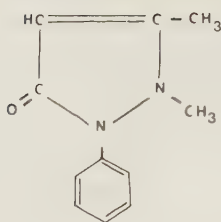
Abb. 20 Darstellung von Aminopyrin aus Phenazon



Aminopyrin bildet farblose Kristalle oder liegt als weißes, kristallines Pulver vor. Es schmeckt schwach bitter. In Wasser und Äther ist es löslich, in 90 %igem Äthanol sogar ausgesprochen leicht löslich. Sein Schmelzpunkt liegt zwischen 107° und 109° C. Wässrige Lösungen reagieren neutral bis schwach basisch; das durch Protonierung gebildete Kation zeigt $\text{pK}_s = 5,1$. Prüfung auf Identität und Reinheit siehe DAB VII.

Phenazon

Abb. 21



2,3-Dimethyl-1-phenyl-pyrazolin-5-on

$C_{11}H_{12}N_2O$

Molekulargewicht 188,2

Die von Knorr durchgeführte Umsetzung molarer Mengen Acetessigester und Phenylhydrazin gilt auch heute noch als Methode der Wahl, den Pyrazolonring darzustellen. Die hieran anschließende Methylierung mit Dimethylsulfat schließt die Phenazondarstellung ab (s. Einleitung).

Phenazon bildet farblose Kristalle oder ein weißes, kristallines Pulver und schmeckt schwach bitter.

In Äther nur wenig löslich, löst es sich leicht in Wasser, 90 %igem Äthanol und in Chloroform.

Sein Schmelzpunkt liegt zwischen 110° und 113° C.

Seine chemischen Eigenschaften sind weitgehend durch die Reaktionsweise der 4-Stellung bestimmt. Entscheidend für deren chemisches Verhalten ist ihre Lage zwischen einer funktionellen Carbonylgruppe und einer Doppelbindung. Der C_4 -gebundene Wasserstoff dissoziiert zwar nicht mehr so leicht ab wie das entsprechende H-Atom des Pyrazolidindionringes mit seinen zwei benachbarten CO-Gruppen, wird

aber recht leicht elektrophil angegriffen. Diese unterschiedliche Reaktionsweise wird zur chemischen Differenzierung der beiden Pyrazolringe herangezogen.

In wässriger Lösung reagiert Phenazon neutral. Es vermag jedoch ein Proton zu assoziieren, ist also eine schwache Base, deren Kation einen pK_s -Wert von 1,6 zeigt.

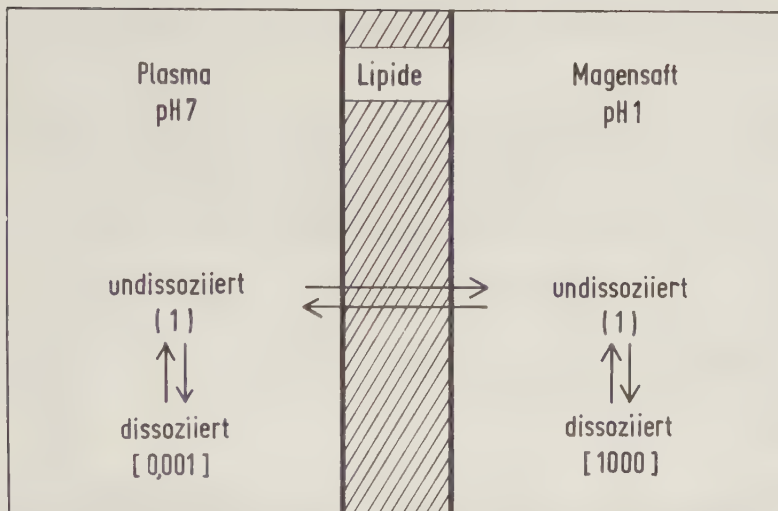
Prüfung auf Identität und Reinheit s. DAB VII.

D) DIE RESORPTION

1. Resorptionsmechanismen

Die Resorption von Arzneimitteln kann als Sonderfall eines umfassenderen Problems gesehen werden: der Passage körperfremder Substanzen durch biologische Membranen. Da klare Vorstellungen hierüber auch wesentlich zum Verständnis von Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung eines Medikamentes beitragen, soll darauf kurz eingegangen werden. Voreingenommen durch sehr spezielle, aktive Mechanismen bei Nahrungsmitteln, Elektrolyten und Vitaminen, hielt man lange Zeit auch bei der Resorption anderer Stoffe ähnlich komplizierte, energiefordernde Transportvorgänge für wahrscheinlich. Brodie und Mitarbeiter (1949, 1950 a, b) konnten in vielen Einzelexperimenten eine Modellvorstellung bestätigen, bei der man die Permeation eines Stoffes durch biologische Grenzflächen im wesentlichen als passive Diffusion der gelösten, freien, undissoziierten Form des Stoffes durch eine Lipoidmembran betrachtet (Abb. 22). Im Vergleich hiermit sind andere Resorptionsmechanismen, beispielsweise der Durchtritt durch interzelluläre Spalten und Poren der Zellmembran sowie die Pinozytose bei den meisten Medikamenten von untergeordneter Bedeutung (Brodie 1967).

Abb. 22 Resorption von Medikamenten (Modellvorstellung)



In diesem Modell erfolgt ein Konzentrationsausgleich lediglich der undissoziierten Form des Mittels (Anilin, pK 4,6). In Abhängigkeit vom pH-Wert verkörpert diese Form zwischen 0 und 100 % der auf einer Seite befindlichen Gesamtmenge. Die Gesamtkonzentrationen beider Seiten können daher erheblich differieren. (nach Brodie, 1967)

2. Zeitlicher Ablauf und Vollständigkeit der Resorption nach peroraler Verabreichung von Pyrazolderivaten

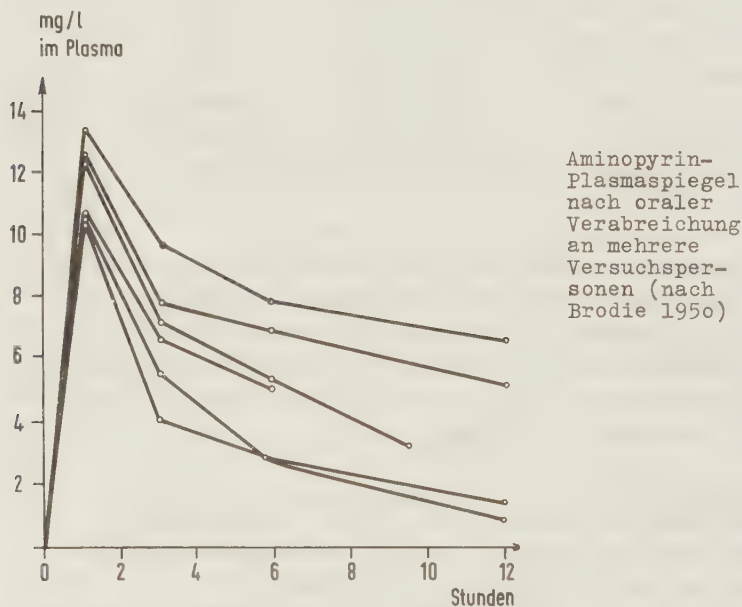
Von größerem praktischen Interesse sind Angaben zum zeitlichen und quantitativen Ablauf der Resorption.

Die enterale Aufnahme der hier in Betracht gezogenen Medikamente muß nahezu vollständig sein, da im Stuhl nur geringe oder gar keine Spuren des eingenommenen Mittels nachweisbar sind.

(Brodie und Axelrod 1950a; Brodie und Axelrod 1950b; Burns und Mitarbeiter 1953; von Rechenberg und Herrmann 1961). Einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der Resorption gibt ein Konzentrations-Zeit-Diagramm seines Blutplasma-spiegels.

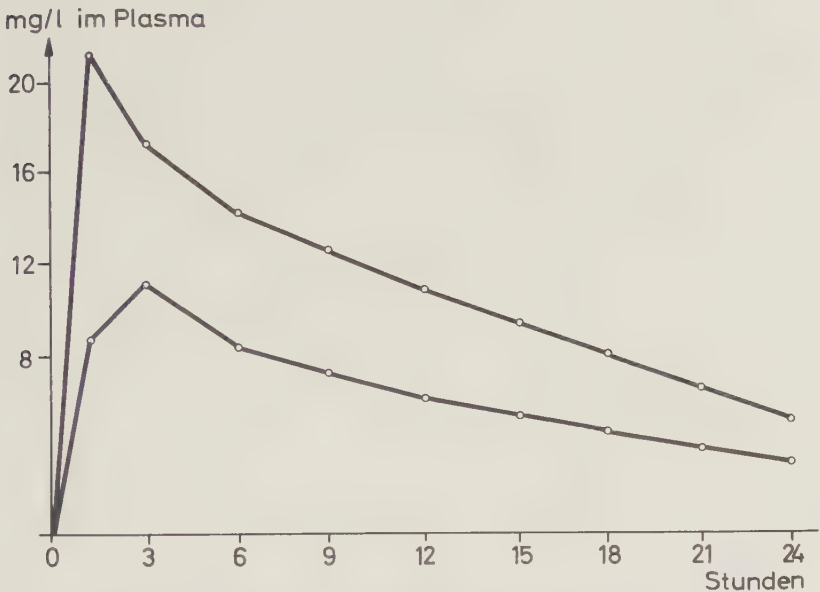
Brodie verabreicht verschiedenen Personen therapeutische Dosen Aminopyrin und bestimmt wiederholt die Konzentration des Mittels im Plasma. Der Verlauf der Konzentrations-zeitkurve deutet darauf hin, daß die Resorption des Mittels schon nach 1-2 Stunden als abgeschlossen gelten kann. (Abb. 23).

Abb. 23



In einem der oben geschilderten Untersuchungen analogen Versuch behandelte Brodie zwei verschiedene Personen mit 300 bzw. 600 mg Antipyrin. Plasmakonzentrationsmaxima finden sich nach ca. 2 - 4 Stunden (Abb. 24).

Abb. 24

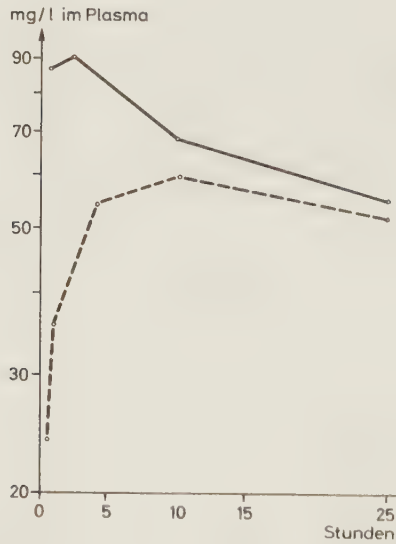


Antipyrin-Plasmaspiegel nach oraler Verabreichung von 300 mg (untere Linie) und 600 mg des Mittels beim Menschen (Brodie, 1950)

Etwa ebenso schnell wie Antipyrin wird Phenylbutazon ins Blut aufgenommen (Abb. 25)

Die Resorption des Oxyphenbutazon scheint gegenüber den bisher besprochenen Medikamenten leicht verzögert abzulaufen. Konzentrationsmaxima werden erst nach 4-8 Stunden erreicht (Abb. 26)

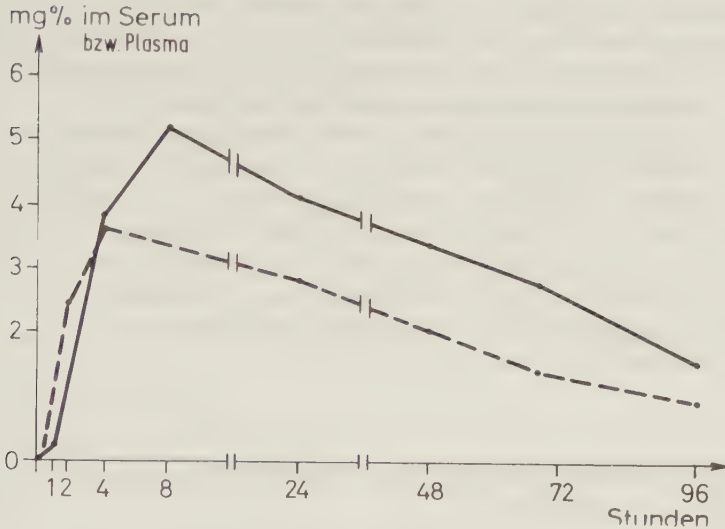
Abb. 25



Phenylbutazon-Plasmaspiegel nach oraler (durchgezogene Linie) und i.m. (gestrichelte Linie) Applikation von je 800 mg bei derselben Versuchsperson.

(Burns 1953)

Abb. 26



Oxyphenbutazon-Konzentrationen nach peroraler Verabreichung im Citratplasma (600 mg, durchgezogene Linie) und im Serum (400 mg, gestrichelte Linie). Mittelwerte von je 5 Versuchspersonen (von Rechenberg 1961).

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß die besprochenen Pyrazole nach peroraler Einnahme therapeutischer Dosen rasch und nahezu vollständig ins Blut aufgenommen werden.

3. Orte maximaler Resorption

Einem jeden Medikament kann ein Abschnitt des Verdauungstrakts zugeordnet werden, in dem es optimal resorbiert wird, denn jedem Abschnitt entspricht ein bestimmtes saures oder basisches Milieu, und in Abhängigkeit vom pH-Wert ändert sich die Menge der freigelösten, undissoziierten Form der Verbindung. So werden Phenylbutazon und Oxyphenbutazon wahrscheinlich im oberen Dünndarmbereich resorbiert. Magensaftresistente Manteltabletten mit den beiden Pyrazolidinen als Wirkstoff vermögen daher die Magenschleimhaut wirksam vor der direkten Reizwirkung beider Mittel zu schützen, ohne ihre Resorption zu behindern. Von dieser Möglichkeit wird in neueren Medikamentspezialitäten Gebrauch gemacht.

4. Untersuchungen zur Resorption bei intramuskulärer und rektaler Applikation

Nach intramuskulärer Injektion gelangt Phenylbutazon langsamer ins Blut als nach peroraler Einnahme, wie der Vergleich der beiden Plasmakonzentrations-Zeit-Diagramme zeigt (s. Seite 32, Abb. 25). Bei Tierversuchen waren noch nach zwei Stunden 15 bzw. 40 % der verabreichten Dosis am Injektionsort nachzuweisen. Amerikanische Autoren nehmen daher eine Bindung oder Fällung des Phenylbutazons am Injektionsort an (Burns 1953). Andere stehen dieser Ansicht skeptisch gegenüber, da solche Fällungen bisher nicht nachzuweisen waren (Rechenberg 1961).

Dennoch sind labile Eiweißbindungen zur Erklärung der experimentellen Befunde nicht von der Hand zu weisen, da

Phenylbutazon, wie auch unten gezeigt wird, eine große Affinität zu Proteinen besitzt.

Eine Reihe weiterer Untersuchungen befaßt sich mit der Resorption von Oxyphenbutazon nach rektaler Applikation (Jakob 1968; v. Rechenberg und Mitarbeiter 1961, Schmitt und Mitarbeiter 1964, Zicha und Mitarbeiter 1965). Auch bei dieser Applikationsart werden regelmäßig therapeutische Plasmaspiegel erreicht, die Resorption verläuft leicht verzögert ab.

E) BLUT- UND ORGANWERTE (VERTEILUNG)

1. Prinzip der Verteilung

Bei der Verteilung des Medikaments im Organismus, einem weiteren, wichtigen Schritt auf dem Wege zu seinem Rezeptor, übernimmt zunächst das Blut die Transportfunktion. Ein Teil mancher Stoffe wird an Plasmaprotein gebunden und bleibt somit zunächst von der weiteren Verteilung ausgeschlossen. Der im Serum verbleibende, freigelöste Rest des Wirkstoffs setzt sich dann dem oben erörterten Modell gemäß mit dem Gewebswasser, den Fettgeweben und lipoidhaltigen Zellelementen ins Gleichgewicht. Denkbar ist auch eine Anreicherung in bestimmten Geweben durch aktiven Transport.

2. Verteilung von Phenylbutazon

a) Proteinbindung und Plasmawerte

Schon die ersten Bestimmungen von Phenylbutazon-Plasma-Konzentrationen in Geweben und biologischen Flüssigkeiten zeigten, daß das Mittel in ungewöhnlich hoher Konzentration im Blut verbleibt (Gsell und Müller 1950). Mit Dialysemethoden wurde nachgewiesen, daß bei den nach therapeutischer Dosierung erreichten Phenylbutazon-Plasma-Konzentrationen von 50 - 150 mg/l nur 1 - 2 % der Gesamtmenge frei gelöst sind, 98 % sind also an die nichtdiffundierenden Bestandteile des Plasmas, an dessen Proteine gebunden.

Bei höherer Phenylbutazon-Konzentration im Plasma sinkt der gebundene Anteil. So betrug er beispielsweise bei

250 mg/l nur noch 88 %. Das Bindungsvermögen des Plasmas ist also offensichtlich begrenzt (Burns 1953).

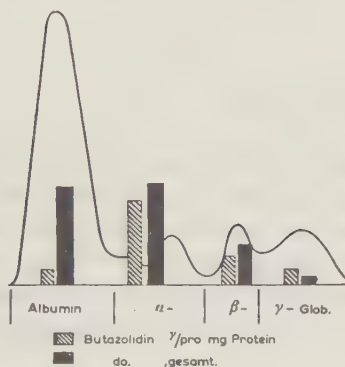
Verschiedene Untersuchungen wiesen unabhängig voneinander nach, daß die besprochene Bindung hauptsächlich an die Albumine und α -Globuline erfolgt (Wunderly 1956; Harwerth und Wöhler 1956, 1957). (Siehe Abb. 27 und Tabelle 3)

Tab. 3 Butazolidin im Eluat

	μ P	μ g/mP
Albumin	2,50	0,4
Globulin	α 2,55	2,2
	β 1,03	0,7
	γ 0,34	0,2

(nach Wunderly 1956)

Abb. 27 Butazolidingehalt der Eiweißfraktionen



Das Wesen der Bindung versucht Wunderly mit einer Diffusion des Phenylbutazons in den Hydratmantel der Proteine zu erklären, er schließt aber auch zusätzliche, salzartige Bindungen des im Blut in seiner Enolatform vorliegenden Phenylbutazons mit basischen Gruppen der Proteine nicht aus (Wunderly 1956).

Die bei therapeutischer Dosierung nahezu vollständige Proteinbindung des Phenylbutazons ist von bedeutendem pharmakokinetischen Interesse. Wenn man das Plasmavolumen mit 5 % des Gesamtgewichts ansetzt, so findet man nach einer Phenylbutazon-Einzeldosis ca. $1/3$ der Gesamtmenge im Plasma (Burns 1953).

Dabei ist die absolute Höhe der Phenylbutazon-Plasmakonzentration abhängig von der Dosierung des Mittels pro kg Körpergewicht und Zeit, der Applikationsart, von Verteilungs- und Eliminationsgeschwindigkeit sowie einer Reihe weiterer, noch unbekannter Parameter. Beim Menschen werden nach peroraler Gabe von 600 - 800 mg/Tag mit grosser Sicherheit therapeutisch wirksame Plasmaspiegel von 5 - 15 mg % erreicht. Zur Änderung des Plasmaspiegels in Abhängigkeit von der Zeit siehe Kapitel "Metabolismus und Ausscheidung".

b) Organwerte bei Mensch und Tier

Trotz Plasmaproteinbindung verteilt sich $2/3$ einer Phenylbutazon-Einzeldosis in dem Raum des menschlichen Körpers, der nicht vom Plasma eingenommen wird. Somit müssen die Organwerte höher liegen, als man der Menge des im Plasma nicht gebundenen Phenylbutazons nach vermuten würde. Burns schreibt dies einer generellen Wechselwir-

kung zwischen Proteinen und Phenylbutazon zu (Burns 1953).

Die bisher in der Literatur veröffentlichten Phenylbutazonorganwerte beziehen sich auf Tierversuche und nur in einem Einzelfall auf den Menschen. Wegen der großen art-spezifischen Unterschiede in der Plasmabindungskapazität für Phenylbutazon sind die im Tierversuch gefundenen Werte nur mit weitgehender Einschränkung auf den Menschen übertragbar. Andererseits sind auch die beim Menschen gefundenen Werte von zweifelhafter Aussagekraft, da, wie Hermann (1960) zeigte, das Bestimmungsverfahren von Burns zumindest teilweise auch Phenylbutazonmetaboliten miterfaßt. Außerdem sind keine Phenylbutazon-Plasma-Konzentrationen angegeben, so daß es nicht möglich ist, Plasma- und Organwerte in Beziehung zu setzen. Diese Unklarheiten und Fehlermöglichkeiten müssen also bei der Würdigung der in Tabelle 4 angegebenen Phenylbutazonorganwerte berücksichtigt werden.

Tabelle 4

Phenylbutazon-Organwerte bei Mensch und Tier

	Meerschweinchen			Ratte		Hund	Mensch
Autor	Harwerth, 1957			Wallace, 1968		Burns, 1953	Burns, 1953
Untersuchungsbedingungen	ca. 400 g schweren Tieren 25 mg C-14 markiertes Butazolidin i.p.			50 mg/kg p.o. Tötung 6 Std. später. Absolutwerte einer weiteren Versuchsreihe in (*) ⁺		50 mg/kg i.v. Tötung 3 Std. später	8 Tage vor Tod tägl. 800 mg. Gewebeentnahme 3 Std. post mort.
Dimension	mg %			Gewebekonz. Blutkonz.		mg/kg	mg/kg
	a	b	c				
Leber	6,0	1,5	0,5	(54,5) ^a 1,25	(17,4) ^a 1,74	64	-
Niere	6,8	3,2	0,6	(37,9) 0,85	(52,3) 1,35	48	70
Nebenniere	5,2	0,7	0,5	-	-	-	80
Herz	3,5	2,6	0,4	-	-	30	55
Milz	3,5	∅	0,1	-	-	-	37
Muskulatur	1,1	0,7	0,03	(8,0) 0,24	(14,3) 0,28	8,1	45
Gehirn	1,0	0,3	0,2	(5,3) 0,15	(8,8) 0,16	15	-
Lunge	4,1	1,5	0,4	-	-	15	78
Fett	-	-	-	(18,4) 0,57	(34,6) 0,58	23	-
Magen	2,0	1,9	0,6	-	-	-	-
Pankreas	3,6	2,2	0,9	-	-	-	-
Hoden	-	0,3	0,2	-	-	-	-
Hämatom	-	1,4	0,7	-	-	-	-

⁺ $\mu\text{g/g (ml)}$

- a) Tötung nach 3 Stunden (Acetonextrakt)
- b) Tötung nach 24 Stunden (Acetonextrakt)
- c) Tötung nach 24 Stunden (Heptanextrakt, weitgehend frei von Metaboliten)

c) Diskussion der gefundenen Werte

Unternimmt man trotz obiger Einwände den Versuch, die vorliegenden Ergebnisse zu interpretieren, so fällt auf, daß in den untersuchten Fällen relativ niedrigen Phenylbutazon-Organwerten in Gehirn und Muskulatur mehrfach höhere Werte in Leber, Nieren und Nebennieren gegenüberstehen. Zum Teil erklärt sich dieses Ergebnis sicher durch die unterschiedliche Blutperfusion beider Organgruppen. Auch aufgrund der geringen Lipoidlöslichkeit des Phenylbutazon würde man eine solche Verteilung erwarten. Insgesamt gesehen erscheinen die Unterschiede doch eher gering. Festzuhalten bleibt, daß die Untersuchungen keinen Hinweis auf eine besondere Phenylbutazon-Affinität eines bestimmten Organs geben. Auffällig sind Beobachtungen mehrerer Autoren, die in entzündlichen Geweben relativ hohe Phenylbutazon-Konzentrationen fanden (Harwerth, 1957; Pulver, 1956). Eine hinreichende Erklärung hierfür konnte bisher nicht gegeben werden.

d) Pharmakologische Bedeutung der Proteinbindung des Phenylbutazon

Das Problem der Proteinbindung ist noch unter weiteren, wichtigen Aspekten zu sehen. So ist sie etwa ein entscheidender Faktor bei der Dauer der Halbwertszeit des Phenylbutazon, erklärt aber auch zwanglos unerwartete Erscheinungen bei gleichzeitiger Verabreichung anderer Mittel. Am Plasmabindungsort kann es zu kompetitiven Wechselwirkungen zwischen zwei Mitteln kommen. Dadurch ändern sich im Vergleich zur gleichdosierten Einzelapplikation die ungebundenen und daher wirksamen Medikamentkonzentrationen. Experimentell wurden solche Wirkungen zwischen Phenylbutazon, einigen Fettsäuren und einer Reihe verschiedener Medikamente festgestellt (Solomon, 1968). Selbstverständlich ist neben der kompetitiven Verdrängung von Arzneimitteln auch die Verdrängung körpereigener Stoffe und Stoffwechselprodukte denkbar, beispielsweise von Hormonen (Kortikoide; vgl. auch unten.) Inwieweit solche Vorgänge zur therapeutischen Wirksamkeit des Mittels beitragen, muß noch näher untersucht werden.

3. Verteilung von Oxyphenbutazon

a) Proteinbindung und Plasmawerte

Ähnlich wie Phenylbutazon ist auch sein Hauptmetabolit Oxyphenbutazon in auffallend hohem Maße an Plasmaproteine gebunden. Die bei therapeutischer Dosierung erreichten Plasmakonzentrationen von 5 - 15 mg % sind nur zu wenig mehr als 1 % frei im Plasma gelöst (Perel, 1964; Yü, 1958).

b) Oxyphenbutazon in Körperflüssigkeiten

Systematische Aufstellungen über Oxyphenbutazon-Organwerte sind in der zur Verfügung stehenden Literatur nicht zu finden. Folgende Einzelbeobachtungen wurden gemacht:

Im Liquor ist beim Gesunden nach therapeutischen Dosen mittels Dünnschichtchromatographie kein Oxyphenbutazon nachzuweisen. (Finger, 1965) Es wird in die Galle ausgeschieden und unterliegt dort möglicherweise einem enterohepatischen Kreislauf.

c) Kompetitive Wechselwirkungen zwischen Oxyphenbutazon und Methandrostenolon

Nach Weiner und Mitarbeitern (1967) ändert sich das Verteilungsvolumen von Oxyphenbutazon, wenn das anabole Steroid Methandrostenolon mitverabreicht wird. Die Glukokortikoide Prednison und Dexamethason zeigen keinen derartigen Einfluß. Methandrostenolon bewirkt keine Änderung des Verteilungsvolumens von Phenylbutazon. Auffallenderweise blieb in letzterem Versuch auch das Verteilungsvolumen des durch Metabolismus aus Phenylbutazon entstandenen Oxyphenbutazon konstant. Zur Erklärung nehmen die Autoren kompetitive Wechselwirkungen der drei Verbindungen am Plasmabindungsort an.

4. Verteilung von Aminopyrin

Nach Shore und Mitarb. (1957) sind beim Aminopyrin nur ca. 15 % der im Plasma enthaltenen Gesamtmenge an Proteine gebunden. Als entsprechend einfach erweist sich sein Verteilungsmodus. Beim Hund fand Brodie folgende Aminopyrin-Organwerte (Tab. 5).

Tab. 5 Pyramidon-Organwerte beim Tier (Hund)

Gewebe	Gewebewasser- konzentration		Verhältnis Gewebewasserkonz. Plasmakonz.	
	Pyramidon mg/kg	N-Acetyl- 4-amino- antipyrin ⁺ mg/kg	Pyramidon	N-Acetyl- 4-amino- antipyrin ⁺
Plasma	51,2	317		
Erythrozyten	38,7	310	0,76	0,97
Leber	65,6	340	1,28	1,07
Milz	53,5	308	1,04	0,97
Muskulatur	44,5	325	0,87	1,03
Lunge	48,0	316	0,94	1,00
Herz	49,5	308	0,96	0,97
Gehirn	40,5	268	0,79	0,85
Cerebrospinal- flüssigkeit	38,0	278	0,74	0,89

Die Organe eines 13 kg schweren Hundes wurden zwei Stunden nach peroraler Verabreichung von 2,5 g Pyramidon entnommen und untersucht. Einem 7,3 kg schweren Hund wurden 2,1 g N-Acetyl-4-aminoantipyrin intravenös verabreicht und sein Gewebe vier Stunden später untersucht (nach Brodie, 1950)

Aufgrund der leicht basischen Eigenschaften des Medikaments kommt es zu einer starken Sekretion des Mittels in den Magensaft. Bei tierexperimenteller Aminopyrin-Dauerinfusion fanden sich nach Gleichgewichtseinstellung Medikamentkonzentrationen im Magensaft, die das 42-fache der entsprechenden Plasmawerte betragen (Shore, 1957).

⁺ N-Acetyl-4-aminoantipyrin
ist ein wichtiger Metabolit
des Pyramidon (s.u.).

5. Verteilung von Antipyrin und seine Anwendung
bei der Bestimmung von Körperwasservolumina

Untersuchungen von Antipyrinorganwerten beim Hund zeigten
folgende interessanten Ergebnisse (Tab. 6):

Tab. 6 Organwerte beim Tier (Hund)

Gewebe	Antipyrinkonz. im Gewebewasser mg/l			Verhältnis Antipyrinkonz. im Gewebewasser Antipyrinkonz. im Plasma		
	Hund1	Hund2	Hund 3	Hund1	Hund2	Hund 3
Plasma	29,2	54,6	148			
Gesamtblut	-	-	147	-	-	1,0
Herz	31,1	56,8	145	1,07	1,04	0,98
Muskelprobe 1	30,6	51,0	145	1,05	0,94	0,98
Muskelprobe 2	30,7	54,6	-	1,05	1,00	-
Milz	30,1	-	149	1,03	-	1,00
Niere	32,5	61,3	154	1,12	1,12	1,04
Leber	30,4	60,0	145	1,04	1,10	0,98
Lunge	24,3	47,1	135	0,83	0,86	0,91
Gehirn	28,9	-	141	0,99	-	0,95
Cerebrospina- flüssigkeit	25,7	53,8	122	0,88	0,99	0,82
Durchschnitt				1,01	1,01	0,97
Abdominelles Fettgewebe	26,3	-	-	0,90	-	-
Perirenales Fettgewebe	28,9	-	-	0,99	-	-

Hund 1 und 3 erhielten je 1,5 g, Hund 2 erhielt 3 g Anti-
pyrin intravenös. 1,5 Std. später Gewebeentnahme bei Hund
1 und 3. Gewebeentnahme bei Hund 2: 2 Std. 45 Min. nach In-
jektion. Gewicht Hund 3: 13 kg (nach Brodie, 1950; Sober-
mann, 1949)

Tabelle 7 zeigt, daß sich Antipyrin innerhalb von zwei Stunden nahezu gleichmäßig im gesamten Körperwasser der Versuchstiere verteilt. Dieser Befund ließ sich auch durch Untersuchungen beim Menschen bestätigen (Tab. 7):

Tab. 7 Organwerte beim Menschen

Gewebe	Antipyrinkonz. im Gewebewasser mg/l		Verhältnis Antipyrinkonzentrat, im Gewebewasser Antipyrinkonzentrat, im Plasma		
	Fall 1	Fall 2	Fall 2	Fall 3	Fall 4
Plasma	-	78,7			
Herz	88,0	78,0	0,99		
Niere	87,0	78,5	1,00		
Leber	103,0	93,0	1,18		
Muskelprobe 1	90,0	65,5	0,83	1,04	1,06
Muskelprobe 2	96,0				
Milz	94,0	72,0	0,92		
Lunge	88,0	70,5	0,90		
Haut	95,0	74,0	0,94		
Perikard- flüssigkeit	-	75,1	0,95		
Durchschnitt			0,96		

Fall 1 und 2:

Beide Patienten nahmen mehrere Tage vor ihrem Tod regelmäßig Antipyrin ein, die letzte Dosis ungefähr 5 Std. vor ihrem Tod. Die Gewebeproben wurden innerhalb 4 Std. post mortem entnommen.

Fall 3 und 4:

Die Muskulaturproben wurden bei Operationen von Patienten entnommen, die Antipyrin eingenommen hatten (nach Sobermann, 1949).

Da Antipyrin außerdem eine nur geringe Diurese und ausreichend kleine Metabolismusraten (ca. 6 % pro Std.) aufweist, kann es zur Bestimmung von Körperwasservolumina herangezogen werden (Brodie 1950; Sobermann 1949). Seine Anwendung bleibt jedoch problematisch wegen der mit seiner Einnahme verbundenen Gefahr möglicher Nebenwirkungen (s. Söder 1973).

F) Metabolismus und Ausscheidung (Elimination)

1. Überblick über die metabolismusspezifischen Strukturen und die bisher bekannten Abbaureaktionen für Arzneimittel, sowie die Bedeutung von Metabolismus und Ausscheidung für den gesamten Organismus

Fragen nach dem Metabolismus körperfremder Substanzen gewannen in den letzten Jahrzehnten stark an Bedeutung. Die Kenntnis der chemischen Veränderung eines Medikaments erwies sich in zunehmendem Maße als unerlässlich für das Verständnis seiner Wirkungsdauer, Dosierung, ja sogar seiner Wirkweise.

Der Metabolismus der Arzneimittel spielt sich an besonderen Zellstrukturen ab, den sogenannten "smooth membranes" des endoplasmatischen Retikulums. Sie finden sich vor allem in den Leberparenchymzellen, aber auch in anderen Organen wie beispielsweise Gehirn und Plazenta.

Mit Zentrifugiermethoden kann man sie als Mikrosomenfraktion abtrennen.

Je weniger polar ein Stoff ist, desto ungehinderter und in höherer Konzentration gelangt er zu den vom übrigen Zellstoffwechsel durch Membranen getrennten Enzymen.

Diese vermögen folgende Reaktionen zu katalysieren:

1. Ringhydroxylierungen
2. Aliphatische Seitenkettenoxydation
3. Desaminierung
4. Spaltung aromatischer Äther
5. Desalkylierung
6. Sulfoxydation
7. N-Oxydation
8. Desulfurierung
9. Azoreduktion
10. Nitroreduktion
11. Reduktion aliphatischer Doppelbindungen
12. Esterspaltung
13. Hydrolyse von Säureamidbindungen
14. Deshalogenierung

Meist unterscheiden sich Substanz und Metabolit in ihren pharmakologischen Eigenschaften. Durch die Umwandlung kann ein harmloses Mittel toxisch werden, oder, was häufiger der Fall ist, eine wirksame Substanz einen Teil ihrer therapeutischen Wirksamkeit verlieren. In einigen Fällen erwies sich die erwünschte Wirkung eines Medikaments als ausschließliche Wirkung eines seiner gebildeten Metaboliten.

Die mikrosomalen Leberenzyme dienen also nur teilweise der direkten Entgiftung der Medikamente. Ihre für den Gesamtorganismus weitaus größere Bedeutung erlangen sie dadurch, daß die durch sie gebildeten Metaboliten polarer sind als ihr Ausgangsprodukt, folglich ihre Membranpermeabilität verringert ist. Geringer wird also auch die Rückdiffusion der Substanz aus dem Lumen der Harnkanälchen ins Blut, die sonst dem Konzentrationsgefälle gemäß ablaufen würde, das sich bei der physiologischen Konzentrierung des Primärharn zwischen Harn und Gewebe ausbildet. Der Metabolit des Medikaments wird in der Regel also zu einem höheren Prozentsatz durch die Nieren ausgeschieden als das Medikament selbst. Wie wichtig für den Organismus die Elimination körperfremder Substanzen ist, zeigt sich auch in der Tatsache, daß bei sehr vielen Präparaten zusätzlich zu dem bisher besprochenen Mechanismus eine aktive Sekretion aus dem Blut in den Harn die Ausscheidung der Stoffe noch weiter beschleunigt.

Anhand von Untersuchungen über den Metabolismus und die Ausscheidung der Pyrazole läßt sich exemplarisch eine Reihe von interessanten Einzelproblemen der biochemischen Pharmakologie verfolgen.

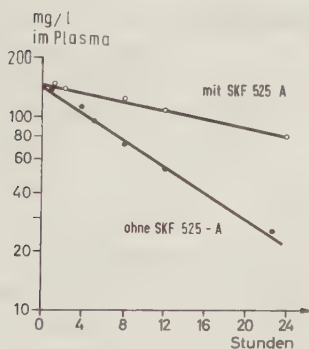
2. Elimination von Phenylbutazon und Oxyphenbutazon
Untersuchungen über die Verteilung von Phenylbutazon zeigten, daß der Mensch selbst bei hoher Dosierung praktisch kein Phenylbutazon unverändert ausscheidet (Burns, 1953) .

a) Phenylbutazonmetaboliten

α) Struktur

Welches sind nun die primären Metaboliten des Phenylbutazon ? SKF-A (β -Diäthylaminoäthyl-diphenylpropylacetat), eine Substanz, die die Aktivität von NADPH₂ und O₂ benötigenden Hydroxylasen zu hemmen vermag, setzt den Phenylbutazonmetabolismus in vivo (Hund) und in vitro (Kaninchenleberhomogenat) in eindeutiger Weise herab (Burns 1955). (Abb. 28)

Abb. 28

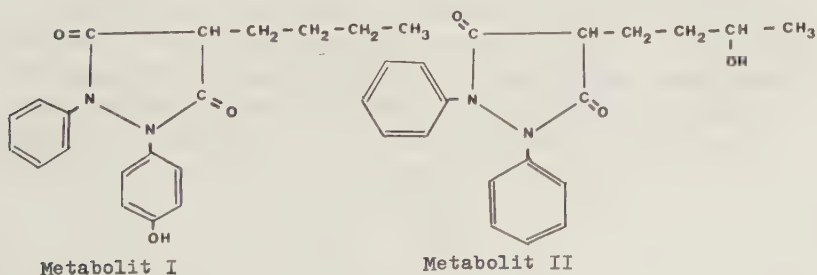


Die Wirkung von SKF 525-A auf den Phenylbutazonmetabolismus

Ein Hund erhielt 50 mg/kg Phenylbutazon i.v. und sein Phenylbutazonplasmaspiegel wurde nach wechselnden Zeitintervallen bestimmt. Zwei Wochen später wurde dieses Verfahren wiederholt, mit Ausnahme, daß dem Hund 30 min vor der Phenylbutazonadministration 40 mg/kg SKF 525-A intraperitoneal verabreicht wurden. Diese Ergebnisse sind typisch für Experimente, die mit drei Hunden durchgeführt wurden (Burns 1955)

Schließlich gelang es Burns (1955), aus dem Harn von Probanden zwei Metaboliten nach Extraktion zu identifizieren.

Abb. 29



Vom Phenylbutazon unterscheiden sie sich durch eine zusätzliche OH-Gruppe.

Der sogenannte Metabolit I trägt eine phenolische OH-Gruppe in p-Stellung zum Phenylrest, die OH-Gruppe des Metabolit II sitzt am β -Kohlenstoffatom des Endes der Butylseitenkette.

β) chemische Eigenschaften

Der Metabolit I ist, wie schon oben aufgeführt, identisch mit Oxyphenbutazon. Seine physikalisch-chemischen Eigenschaften wurden bereits besprochen. Er wird im Urin in einer Menge ausgeschieden, die etwa 3 % der verabreichten Phenylbutazonosis entspricht.

Der Metabolit II zeigt folgende Eigenschaften:

Schmelzpunkt: $156^{\circ}\text{C} - 158^{\circ}\text{C}$
Spez. Drehung: $\left[\alpha\right]_{\text{D}}^{26,5} = -24^{\circ} (\text{C } 5,09; \text{CHCl}_3)$
Nachweis: s. Seite 92

γ) Pharmakokinetik und pharmakologische Eigenschaften

Im Urin wird der Metabolit I in einer Menge ausgeschieden, die etwa 5 % der verabreichten Phenylbutazonosis entspricht. Die Halbwertszeit beträgt durchschnittlich ca. 10 Stunden und ist somit wesentlich kürzer als die von Phenylbutazon und Oxyphenbutazon.

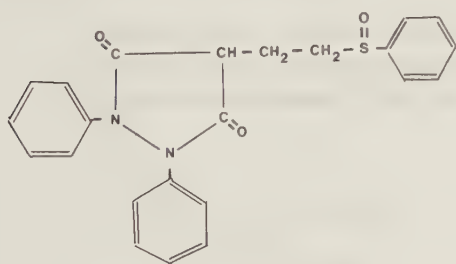
Werden beide Metaboliten einzeln i. v. appliziert - bei peroraler Anwendung wird Metabolit II nicht resorbiert -, so findet man nur geringe Mengen unverändert im Harn wieder (Burns, 1955; ca. 4 % Metabolit I; ca. 15 % Metabolit II). Aus der Konzentration der Metaboliten im Harn können also keine Rückschlüsse auf ihre Konzentration im Plasma gezogen werden.

In klinischen Studien fiel die stark urikosurische Wirkung des Metabolit II auf.

Systematisch vergleichende Untersuchungen über Diphenyldioxypyrazolidin-Abkömmlinge ergaben einen ausgeprägt antirheumatischen Effekt bei Einführung funktioneller Gruppen in die p-Stellung eines Phenylrings, eine stark urikosurische Wirkung bei Einführung funktioneller Gruppen in die Butyl-Seitenkette. Dabei ist bemerkenswert, daß der urikosurische Effekt desweiteren eng mit der Azidität dieser Mittel verknüpft ist. Es wird vermutet, daß diese Medikamente den in seinen Einzelheiten noch weitgehend ungeklärten Transportmechanismus blockieren, der in der Niere zur Rückresorption der Harnsäure aus den proximalen Tubulusabschnitten ins Plasma beiträgt (Burns, 1960).

Im Anturan^R wird diese Eigenschaft der Pyrazolidine therapeutisch genutzt.

Abb. 30



Anturan^R

1,2-Diphenyl-4-(2-phenylsulfinylethyl)-3,5-pyrazolidin-dion

Anturan^R ist ein Mittel, das bei Nierengesunden häufig zur Senkung eines pathologisch erhöhten Harnsäurespiegels verwendet wird.

Wird Phenylbutazon über längere Zeit hinweg in gleicher Dosierung angewandt, so stellt sich zwischen ihm und seinen Primärmetaboliten ein Gleichgewicht ein.

Der Anteil der beiden Metaboliten an der Gesamtkonzentration (Phenylbutazon + Metabolit I + Metabolit II) beträgt dabei etwa 30 - 50 %. Da nach Untersuchungen von Herrmann (1960) die dabei zu berücksichtigenden Metabolit II-Konzentrationen wegen dessen relativ schnellem Abbau unbedeutend sind, entspricht dieser Prozentsatz im Wesentlichen der Konzentration des Metabolit I.

δ) weitere, noch nicht identifizierte Metaboliten

So genau auch zwei Primärmetabolite des Phenylbutazons bekannt sind, über den Verbleib der restlichen rund 92 %, die nicht als Metabolit I oder II ausgeschieden werden, sind in der Literatur nur ungenaue Hinweise und Vermutungen zu finden.

Wird der Harn von Personen, die Phenylbutazon eingenommen haben mit β -Glukuronidase inkubiert, so gelingt es nicht, einen Anstieg an freier Glukuronsäure nachzuweisen. Phenylbutazon wird also nicht als Glukuronsäurepaarling ausgeschieden (Burns, 1953) ⁺.

Insgesamt vier Metabolitfraktionen konnten nach Oxyphenbutazongabe im Harn dünnstschichtchromatographisch nachgewiesen werden (Finger, 1965). Ihre Identifizierung steht jedoch noch aus.

⁺ Phenylbutazon-Glukuronsäurepaarlinge sind im Urin nicht sehr stabil. Unterstellt man daher eine in der Messung nicht erfaßte, frühzeitige Verseifung, so trifft obige Aussage dennoch zu, da im Harn auch kein freies Phenylbutazon nachweisbar war.

ε) Halbwertszeiten und Metabolismusraten

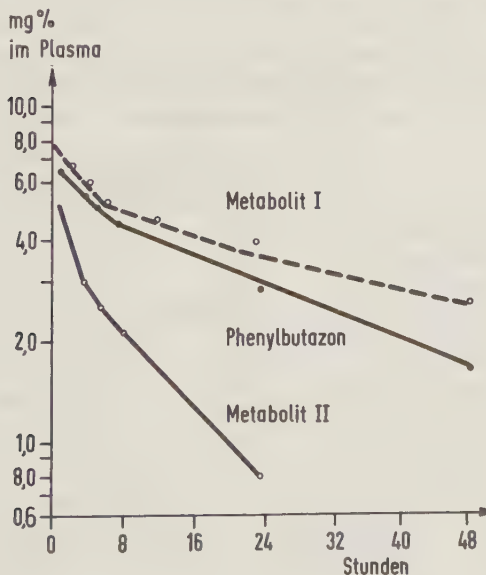
Da der größte Teil eingenommenen Oxyphenbutazons und nahezu die Gesamtheit eingenommenen Phenylbutazons im Körper metabolisch transformiert werden, geben Plasmakonzentration-Zeit-Diagramme in der sich der Resorption und Verteilung anschließenden Phase einen guten Einblick in den Umfang der metabolischen Aktivität.

Die durchschnittliche Halbwertszeit für Phenylbutazon im Plasma beträgt 72 Std.⁺ (nach Burns, 1953; Perel, 1964; Herrmann, 1960; Levi, 1968; Wilbrandt, 1964; u.v.a.), die Halbwertszeit für Oxyphenbutazon etwa 48 - 72 Std.⁺ (nach Perel, 1964; Burns, 1955; Wilbrandt, 1964) (Vgl. Abb. 31).

Diese im Vergleich zu anderen Medikamenten großen Werte erklären sich wohl aus dem hohen Plasmabindungsanteil beider Mittel.

⁺meistangegebene Werte

Abb. 31



Plasmaspiegel des Metabolit I, Metabolit II und Phenylbutazon nach einer 600 mg i.v. Dosis jeder dieser Verbindungen, jeweils bei der gleichen Versuchsperson (Burns, 1960)

3. Spezielle Angaben über den Arzneimittelmetabolismus, dargestellt anhand von Untersuchungen mit Phenylbutazon und Oxyphenbutazon

a) Unterschiedliche Metabolismusraten zwischen verschiedenen Arten

Oxyphenbutazon kann als geradezu klassisches Beispiel für unterschiedliche Halbwertszeiten bei verschiedenen Tierarten gelten. Wäre es nicht im Menschen selbst entdeckt und daher gleich an ihm selbst erprobt worden, am Hund auf seine therapeutische Wirksamkeit hin geprüft, wäre sein Wert wohl nie erkannt worden, da bei ihm die Elimination des Medikaments und damit das Absinken des Medikamentplasmaspiegels unter die therapeutische Schwellendosis etwa 144-fach schneller verläuft als beim Menschen.

Ähnlich große Speziesunterschiede in seiner Metabolisierungsgeschwindigkeit zeigt auch Phenylbutazon, wie die folgende Aufstellung zeigt (Tab. 8).

Tab. 8 Unterschiedliche Phenylbutazon- und Oxyphenbutazon-Halbwertszeiten bei verschiedenen Arten

		Medikament	
		Phenylbutazon	Oxyphenbutazon
Ratte	Halbwertszeit (Std)	6	6
	Dosis (mg/kg)	100	50
	Speziesverhältnis *	12	9
Kaninchen	Halbwertszeit (Std)	3	4
	Dosis (mg/kg)	100	50
	Speziesverhältnis *	24	18
Hund	Halbwertszeit (Std)	7	0,5
	Dosis (mg/kg)	50	50
	Speziesverhältnis *	10	144

*) Speziesverhältnis = $\frac{\text{Halbwertszeit (Mensch)}}{\text{Halbwertszeit (Tier)}}$ (nach Perel 1964)

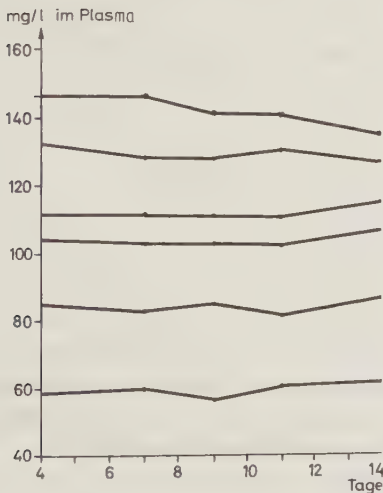
b) unterschiedliche Metabolismusraten
innerhalb der gleichen Art

Häufiger noch als die zwischen den verschiedenen Arten auftretenden Unterschiede in der Metabolismusrate wurden die entsprechenden Unterschiede innerhalb der Arten zum Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

Wegen des nur langsamen Abbaus von Phenylbutazon stellt sich bei über längere Zeit erfolgender, dosiskonstanter Phenylbutazon-Applikation ein sogenanntes Phenylbutazon-Plateau im Plasma ein, d.h., seine Konzentration im Plasma bleibt nahezu gleich.

Liegt dieses Plateau bei dem Einen hoch, so muß dessen Metabolismusrate niedriger sein als die eines Anderen, der trotz gleicher Dosierung niedrige Werte aufweist. Die Abbildung 32 gibt daher einen Eindruck von der Streubreite der Metabolismusrate beim Menschen.

Abb. 32

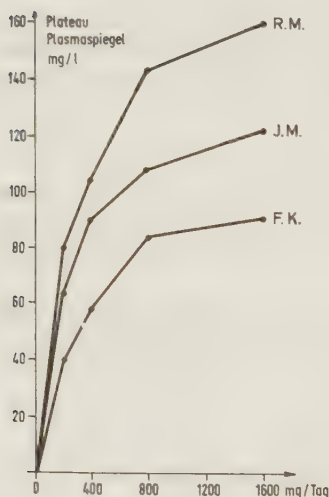


Phenylbutazonplasma-
spiegel bei täglicher
Verabreichung von
800 mg/Tag. Die Zeit
bezieht sich auf den
ersten Tag der Ad-
ministration des Mit-
tels.

(nach Burns, 1968)

Interessanterweise sind diese Plateaus beim Einzelnen nur im Bereich kleiner Dosen (< 800 mg) proportional der eingenommenen Menge. Wird höher dosiert, so nähern sich die Plateaus einer Grenzkonzentration, die in dem für den Menschen unschädlichen Bereich nicht überschritten wird (vgl. Abb. 33). Eine Dosierung über 800 mg hinaus erscheint daher als therapeutisch wenig sinnvoll. (Burns, 1953)

Abb. 33



Phenylbutazon-Plasma-spiegel-Plateaus bei drei Versuchspersonen auf sukzessive Gabe von 200, 400, 800 und 1600 mg Phenylbutazon täglich. Jeder Punkt stellt ein Plasmaspiegel-Plateau dar, welches nach der jeweiligen Dosierung erreicht wurde. (nach Burns, 1953)

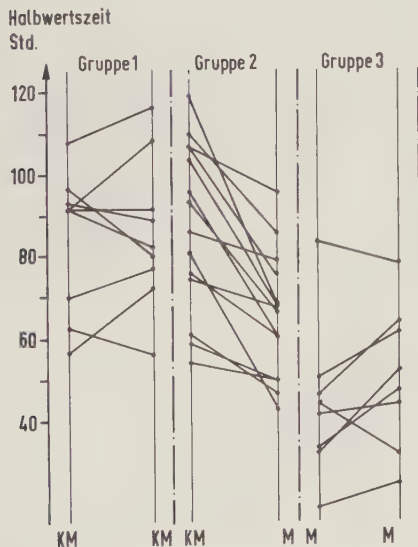
Diese Beobachtungen werden erklärt mit einer langsamen Ab-sättigung der Plasmabindungsstellen im dosisproportionalen Bereich und einem raschen Abbau der die Plasmabindungs-kapa-zität übersteigenden, ungebundenen Phenylbutazonmenge.

c) Enzyminduktion

Vielfach konnte in Tierversuchen die Verkürzung der Halbwertszeit eines Medikaments als Folge einer Fremd- oder Eigeninduktion von metabolisch aktiven Enzymen nachgewiesen werden.

Auch beim Menschen sind dementsprechende Vorgänge zu beobachten. So bewirkt eine Vorbehandlung mit Phenobarbital (3 Tage 90 mg/die) eine signifikante Halbwertszeitverkürzung des Phenylbutazon. (Levi, 1968) (Abb. 34)

Abb. 34



Phenylbutazonhalbwertszeit bei 32 Versuchspersonen. Bei jeder zwei Untersuchungen.

Gruppe 1:
Keine Vorbehandlung vor beiden Untersuchungen.

Gruppe 2:
Keine Vorbehandlung vor dem ersten, eine "signifikante Vorbehandlung" vor dem zweiten Test.

Gruppe 3:
"Signifikante Vorbehandlung" vor beiden Untersuchungen.

Die durchschnittliche Halbwertszeitverkürzung ist nur in Gruppe 2 signifikant ($p < 0,01$). (nach Levi, 1968)

d) Einfluß von Lebererkrankungen

Burns fand bei seinen Untersuchungen keinen Einfluß von Lebererkrankungen auf die Halbwertszeit des Phenylbutazons. (Burns, 1953). Da diese Beobachtung im Widerspruch zu Untersuchungsergebnissen bei anderen Medikamenten stand, wurde sie einer genauen Überprüfung unterzogen (Levi, 1968) (Abb. 35)

e) genetischer Einfluß

Diese Untersuchungen, die auf einen erheblichen Einfluß der Umweltfaktoren auf die Metabolismusrate schließen lassen, werden durch Untersuchungen von Vesell (1968) und Whittacker (1970) erheblich relativiert.

Anhand experimenteller Studien mit jeweils 7 genotypisch identischen und nichtidentischen Zwillingspaaren wiesen Vesell und Page 1968 nach, daß das metabolische Verhalten des Menschen Phenylbutazon gegenüber weitgehend genetisch festgelegt ist.

Bei einer Dosierung von 6 mg/kg p.o. erwiesen sich dabei die Phenylbutazon-Halbwertszeitunterschiede zwischen mono- und dizygoten Zwillingen hinsichtlich der geschwisterlichen Varianz als hochsignifikant ($p < 0,001$).

Die statistische Auswertung einer Untersuchung mit 142 Versuchspersonen zeigte, daß der Phenylbutazonmetabolismus des Menschen einer polygenetischen Kontrolle unterliegt. Er wird in ähnlicher Weise und in etwa gleichem Umfang genetisch kontrolliert wie die Körpergröße.

(Whittacker, 1970)

(Weitere Untersuchungen zur genetischen Kontrolle des Arzneimittelmetabolismus s.S. 86.)

4. Elimination von Aminopyrin

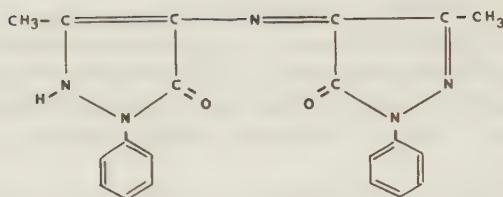
- a) Aminopyrinmetaboliten
Erstbeschreiber, Struktur und
Pharmakokinetik

α) Rubazonsäure

Die nach Aminopyrineinnahme auftretende, auffällige Rotfärbung des Harns forderte eine wissenschaftliche Erklärung geradezu heraus. Schon kurz nach der Jahrhundertwende gelang es Jaffe (1901), den unbekannten Farbstoff aus Menschen- und Hundeharn zu extrahieren und als die schon von Knorr synthetisierte Rubazonsäure zu identifizieren. (Abb. 37)

Abb. 37

Rubazonsäure



Die strukturelle Verwandtschaft mit Pyramidon war evident und konnte daher als richtungsweisender Anreiz für weitere, Zwischenschritte des Pyramidonstoffwechsels klärende Untersuchungen dienen.

β) 4-Amino-antipyrin und
N-acetyl-4-aminoantipyrin

Aber trotz der wachsenden Bedeutung, die Pyramidon im Laufe der folgenden Jahre auf dem Arzneimittelmarkt erlangte, wurden Jaffe's Untersuchungen erst nach Jahrzehnten aufgenommen und fortgeführt. 1949 legten Halberkann und Fretwurst ihre Ergebnisse in einer schon 1940 angekündigten, umfassenden Arbeit nieder. Im Harn von Probanden fanden sie mehrere bis dahin unbekannte Aminopyrin-Metaboliten. Zwei dieser Umwandlungsprodukte waren bei allen Versuchen nachzuweisen und entsprachen zusammen etwa 50 % des eingenommenen Pyramidon. Durch Vergleich mit authentischen Testsubstanzen wurden sie als Aminooantipyrin und Acetylaminoantipyrin identifiziert (Abb. 38 und 39).

Abb. 38 4-Amino-antipyrin

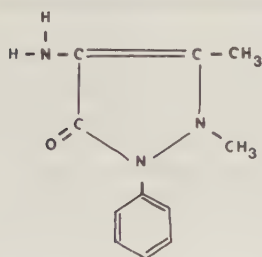
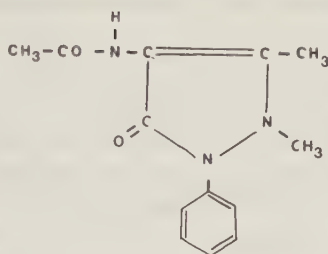


Abb. 39 N-acetyl-4-aminoantipyrin



Etwa zur gleichen Zeit befaßten sich im englischsprachigen Raum Brodie und Axelrod mit dem "Schicksal des Aminopyrin im Menschen" (1950), und es ist recht reizvoll, die Ergebnisse beider Arbeiten vergleichend im Zusammenhang zu sehen.

Bei einem Einzelversuch fanden Halberkann und Fretwurst 28,9 % des eingenommenen Pyramidon als Acetylaminopiridin und 22,8 % als Aminopiridin im Harn wieder.

In Brodies Versuchsreihen verschob sich das Mengenverhältnis der beiden Metaboliten noch mehr zugunsten des Acetylaminopiridins und gleichzeitig wurde die individuelle Streubreite dieser Werte deutlich (Tab. 9).

Tab. 9

Fall	Pyramidon %	4-Amino- antipyrin %	N-Acetyl- 4-amino- antipyrin %
1	2,0	5,1	46
2	3,3	6,0	41
3	4,4	12,0	27
4	2,8	5,7	39
5	3,6	12,5	26

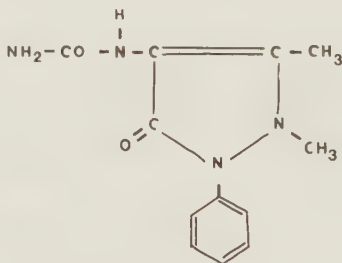
Nachweis von Pyramidon und seinen Metaboliten im Urin von Versuchspersonen, die eine Einzeldosis von 500 mg Pyramidon eingenommen hatten. Der Urin wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden hinweg gesammelt. Die Menge des zusammen mit seinen 2 Metaboliten ausgeschiedenen Pyramidon ist in Prozent der eingenommenen Pyramidondosis angegeben (n. Brodie, 1950).

Brodie fand auch Spuren von unverändertem Aminoantipyrin. Den deutschen Autoren war dieser Nachweis trotz wiederholten Bemühens nur in einem Einzelfall, bei einem Sterbenden, gelungen.

γ) Antipyrilharnstoff

Dafür gelang es ihnen, den von Jaffe (1902) schon im Hundeharn gefundenen Antipyrilharnstoff auch aus menschlichem Harn zu isolieren, wenn auch nur "..... unter großer Mühe nur einmal in sehr geringer Menge."

Abb. 40

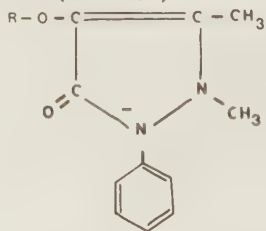


Antipyrilharnstoff

δ) konjugiertes 4-Hydroxyantipyrin

Übereinstimmend kamen beide Arbeitskreise zu dem Ergebnis, daß ein weiterer Metabolit des Pyramidon, das Hydroxyantipyrin, beim Menschen nur in geringem Maße (Brodie: 5 % der eingenommenen Pyramidon-Dosis) und zwar als Konjugat ausgeschieden wird. (Abb. 41)

Abb. 41



(R=Glukuronat oder Sulfat)

konjugiertes 4-Hydroxyantipyrin

ε) 4-Methylaminoantipyrin und
4-Methylacetylaminoantipyrin

Die beiden in größerem Umfang ausgeschiedenen Aminopyrinmetaboliten wurden als Produkte einer stufenweisen Demethylierung des Pyramidon und teilweiser anschließender Acetylierung betrachtet.

Diese Deutungsweise ließ folgende Zwischenstufen erwarten:

Abb. 42

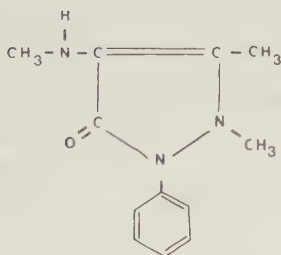
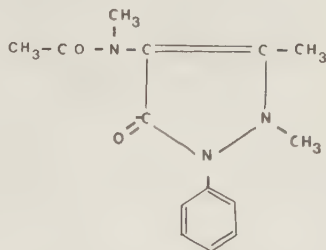


Abb. 43



4-Methylaminoantipyrin

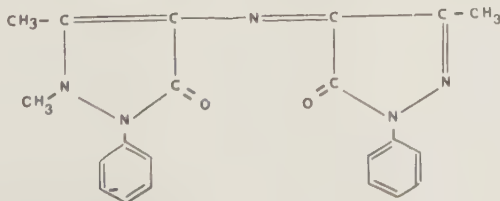
4-Methylacetylaminoantipyrin

Tatsächlich wurden beide Verbindungen später nach Pyramidoneinnahme im Harn nachgewiesen (Pechtold 1964, Schüppel 1965, Vecerkova und Mitarbeiter 1967).

ζ) Hinweise auf noch nicht identifizierte Aminopyrin-Metaboliten und Methylrubazonsäure

Vecerkova und Mitarbeiter (1966) fanden außerdem auf ihren Papierchromatogrammen einige weitere ungefärbte, und fünf karminrote Substanzflecke, die keinem bis dahin beschriebenen Pyramidon-"Stoffwechselprodukt" zuzuordnen waren. Etwa gleichzeitig mit Preuß (1965), Pechtold (1964) und Schüppel (1965) identifizierten sie einen der Farbstoffe als Methylrubazonsäure.

Abb. 44



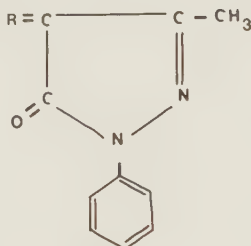
Methyl-
rubazon-
säure

7) Diketopyrazolin

Eine wichtige Entdeckung im Zusammenhang mit der Frage, wie die beiden bisher bekannten, aus Pyramidon entstandenen Farbstoffe im Menschen entstehen, machten Preuß und Voigt (1965):

es gelang ihnen, im Harn einen Aminopyrinmetaboliten als Oxim nachzuweisen, der die folgende allgemeine Strukturformel besitzt:

Abb. 45

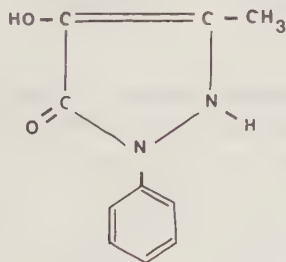


Nach Untersuchungen von Schüppel (s. auch Metabolismus des Antipyrin) stellt dieser Metabolit die gebundene Form des 1-Phenyl-3-methyl-4-ketopyrazolon-(5) (kurz: Diketopyrazolin) dar, das seinerseits im Körper nach N₂-Demethylierung und anschließender Dehydrierung aus dem schon oben erwähnten Hydroxyantipyrin hervorgeht. (Wittmann und Schüppel, 1968).

Ungebunden zeigt sich das Diketopyrazolin sehr reaktionsfreudig, bildet mit Aminoantipyrin Methylrubazonsäure, mit N₂-demethyliertem Aminoantipyrin Rubazonsäure. Seine Beteiligung bei der Bildung dieser beiden Farbstoffe ist daher sehr wahrscheinlich, obgleich es in seiner freien Form bisher weder im Harn, noch im Blut nachgewiesen werden konnte.

g) Acetylamino-3-methyl-1-phenyl-pyrazolon (5)

Der Nachweis weiterer Pyramidonmetaboliten, die am N₂ des Pyrazolonkerns demethyliert sind und auf deren Vorkommen das gefundene Diketopyrazolin schließen läßt, scheint ähnlich schwierig zu sein. So kam bei der Entdeckung des Acetylamino-3-methyl-1-phenyl-pyrazolon (5) der Zufall zur Hilfe. Um kräftiger und haltbarer gefärbte Substanzflecke zu erhalten, entwickelte Klug (1970) die nach der Methode von Schüppel gewonnenen Pyramidon-Dünnschichtchromatogramme mit Ehrlichs Reagens. Dabei färbte sich der dem Acetylaminoantipyrin entsprechende Substanzfleck gelb, das zur Kontrolle mitgelaufene Acetylaminoantipyrin selbst aber nicht. Der Substanzfleck konnte schließlich in Acetylaminoantipyrin und Acetylamino-3-methyl-1-phenyl-pyrazolon (5) aufgetrennt werden (Abb. 46)



Klug weist darauf hin, daß der von ihm gefundene Metabolit möglicherweise die in früheren Untersuchungen (s.o.) aufgestellten Stoffwechselbilanzen für Pyramidon verfälscht hat. Eine von ihm durchgeführte Untersuchung brachte folgende Ergebnisse: (Tab. 10)

Tab. 10

Durchschnittliche Harnkonzentrationen des Amidopyrin und seiner Metaboliten nach therapeutischen Gaben von Pyramidon
(nach Klug 1970)

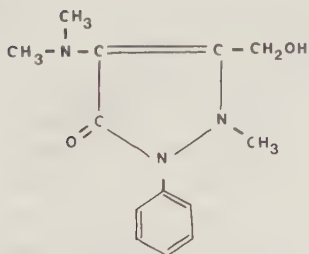
	S a m m e l u r i n		
	0 - 8 h	8 - 16 h	16 - 24 h
Amidopyrin	0,8 mg%	-	-
Methylamino-phenazon	1,0 mg%	1,0 mg%	-
Aminophenazon	0,5-3 mg%	1,5 mg%	-
Acetylamino-phenazon	2-5 mg%	2-3 mg%	2-3 mg%
Neuer Metabolit	3 mg%	2-3 mg%	2-3 mg%

Demnach wird das Acetylamino-3-methyl-1-phenyl-pyrazolon (5) in etwa der gleichen Menge im Harn ausgeschieden wie das Acetylaminoantipyrin.

- l) 4-Dimethylamino-3-hydroxymethyl-2-methyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on
und
4-Dimethylamino-2-methyl-5-oxo-1-phenyl-3-pyrazolin-3-carboxylsäure

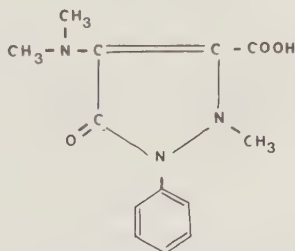
Als vorerst letzten Angriffspunkt der Aminopyrin-abbauenden Enzyme konnten Yoshimura und Mitarbeiter (1970) die C₃-gebundene Methylgruppe des Pyrazolonkerns nachweisen. Im Rattenharn fanden sie 4-Dimethylamino-3-hydroxymethyl-2-methyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on (s. Abb. 47).

Abb. 47



4-Dimethylamino-3-hydroxymethyl-2-methyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on

Abb. 47a



4-Dimethylamino-2-methyl-5-oxo-1-phenyl-3-pyrazolin-3-carboxylsäure

Zwei weitere Oxydationsschritte lassen daraus 4-Dimethylamino-2-methyl-5-oxo-1-phenyl-3-pyrazolin-3-carboxylsäure entstehen (s. Abb. 47a). Der dabei intermediär zu erwartende 4-Dimethylamino-2-methyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on-3-formaldehyd konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden (Yoshimura 1970).

b) Metabolismus des Aminopyrin aufgrund der
bisher im Harn nachgewiesenen Metaboliten
Übersicht



A Aminopyrin, MAA 4-Methylaminoantipyrin, MAAA 4-Methyl-acetylaminantipyrin, AA 4-Aminoantipyrin, AAA 4-Acetyl-aminoantipyrin, PMRP eine bisher nicht näher identi-
fizierte, von Preuss und Voigt beschriebene Substanz, HA
4-Hydroxyantipyrin, HAG Glucuronid des 4-Hydroxyantipy-
rins, AH Antipyrinlarnstoff, RS Rubazonsäure, MRS Methyl-
rubazonsäure N₍₂₎, AAA 1-Phenyl-3-methyl-4-acetylaminopyra-
zolon-(5), 3-CS-A 4-Dimethylamino-2-methyl-5-oxo-1-phe-
nyl-3-pyrazolin-carboxylsäure.

———— nachgewiesener Weg; ————|——— Weg
über einen unbekannten Präkursor; ————|——— Weg
angenommener Weg.

c) Halbwertszeiten und Metabolismusraten des Aminopyrin

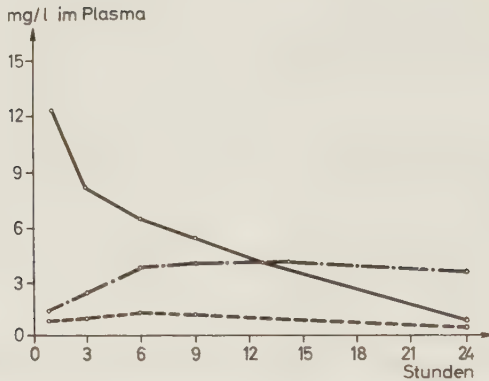
Die am Harn gewonnenen Einblicke in den Metabolismus des
Pyramidon können naturgemäß nur qualitativer Art sein,
da sich während der Ausscheidung die Mengenverhältnisse
der Metaboliten zueinander in quantitativ nicht voraus-
sagbarer Weise ändern.

Quantitative Angaben zum Pyramidonmetabolismus im Men-
schen sind in der Literatur selten und nahezu ausschließ-
lich auf die Bildung und Verhaltensweise der beiden Pyra-
midon-Hauptmetaboliten 4-Aminoantipyrin und N-Acetyl-4-
aminoantipyrin beschränkt.

In Reihenuntersuchungen erweist sich die Abbaurate des
Aminopyrin als individuell recht verschieden. Sie schwankt
zwischen 10 - 30 % pro Stunde (vgl. Abb. 24)(Brodie
1950). Wegen der konstant geringen Ausscheidung im Harn
handelt es sich dabei wahrscheinlich um Unterschiede in
der chemischen Transformation, wie sie für Phenylbutazon
schon beschrieben wurde.

Wird gleichzeitig mit der Plasmakonzentration des Pyrami-
don auch die seiner beiden Hauptmetaboliten bestimmt, so
findet man im typischen Fall das in Abb. 49 wiedergege-
bene Plasmakonzentrations-Zeit-Diagramm:

Abb. 49



Plasmaspiegel von Pyramidon (durchgezogene Linie) und seinen Metaboliten 4-Aminoantipyrin (gestrichelte Linie) und N-Acetyl-4-aminoantipyrin (strich-punkt-strich-Linie) nach i.v. Verabreichung von 500 mg Pyramidon beim Menschen (nach Brodie, 1950).

Im Sinne einer negativen e-Funktion nimmt die Pyramidonkonzentration gleichmäßig ab. Der Plasmaspiegel des 4-Aminoantipyrin bleibt beträchtlich unter dem Wert seiner Muttersubstanz. Der N-Acetyl-4-aminoantipyrinspiegel ist zuerst niedrig, steigt allmählich bis knapp unter den des Pyramidon und bleibt noch längere Zeit nahezu gleich; währenddessen sinkt der Pyramidonspiegel auf vernachlässigbar kleine Werte ab.

d) Zur Pharmakologie der Pyramidonmetaboliten

Ähnlich wie das Pyramidon selbst wird auch 4-Aminoantipyrin zu ca. 15 - 20 % an Plasmaeiweiß gebunden; sein Acetylierungsprodukt N-Acetyl-4-aminoantipyrin hingegen liegt im Plasma nahezu vollkommen ungebunden vor (Brodie, 1950). Letzteres hat zudem noch weitere bemerkenswerte Eigenschaften: da es sich relativ schnell und gleichmäßig im gesamten Körperwasser des Menschen verteilt, eine hinreichend geringe Metabolisierungs- und Ausscheidungsgeschwindigkeit besitzt und zudem auch noch einfach und genau (s. "Nachweismethoden") quantitativ bestimmt werden kann, wurde es als Mittel zur Bestimmung von Körperwasservolumina vorgeschlagen.

(Brodie 1950). In der Praxis hat sich seine Anwendung nicht durchsetzen können.

Im Gegensatz zu N-Acetyl-4-aminoantipyrin, das sich pharmakologisch als weitgehend indifferent erwies, zeigte 4-Aminoantipyrin im Tierversuch nahezu gleiche Eigenschaften wie Pyramidon. Auch beim Menschen wurde es verschiedentlich gegen rheumatisches Fieber angewandt (Brodie 1950). Da man jedoch das von Pyramidon her bekannte, im Tierversuch nicht reproduzierbare, folglich unkontrollierbare Auftreten von Agranulozytosen befürchtete, wurde es, soweit bekannt, nicht in größerem Maße therapeutisch genutzt.

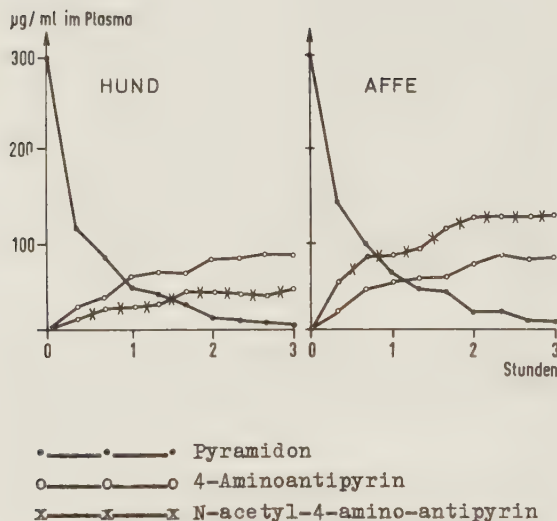
e) Untersuchungen zum Arzneimittelmetabolismus mit Hilfe von Aminopyrin

α) Tierversuche

Die Fähigkeit, körperfremde Substanzen zu azetylieren, ist bei verschiedenen Arten sehr unterschiedlich stark ausgebildet.

Bei nach Pyramidongabe vergleichbaren 4-Aminoantipyrinkonzentrationen sind die entsprechenden N-Acetyl-4-aminoantipyrinwerte beim Hund nicht einmal halb so groß wie beim Affen (Arrigoni 1967) (Abb. 50).

Abb. 50



Plasmaspiegel von Pyramidon und seinen beiden Hauptmetaboliten.

Links:

Experiment mit einem Hund von 23,0 kg. Kapazität des extrakorporalen Kreislaufs: 600 ml. Durchströmungsgeschwindigkeit des extrakorporalen Kreislaufs: 115 ml/min. Initiale Pyramidonplasmakonzentration im extrakorporalen Kreislauf: 300 µg/ml.

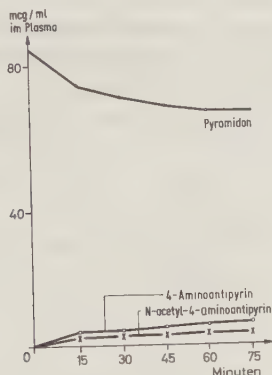
Rechts:

Experiment mit einem Affen von 15,8 kg. Kapazität des extrakorporalen Kreislaufs: 500 ml. Durchströmungsgeschwindigkeit des extrakorporalen Kreislaufs: 80 ml/min. Initiale Pyramidonplasmakonzentration im extrakorporalen Kreislauf: 300 µg/ml.

Die gefundenen Werte geben die metabolische Aktivität der in vivo isolierten Leber wieder. Sie wurden in einem experimentell betriebenen, extrakorporalen Blutkreislauf bestimmt, der nur die in situ verbliebene Leber einschloß. Mit der gleichen Methode wurden auch die metabolischen Fähigkeiten des Hunde- und Affenhirns untersucht (Benzi 1967).

Wie erwartet, sind Metabolismusrate und Metabolitenkonzentration wesentlich kleiner als die oben angegebenen, entsprechenden Leberwerte (Abb. 51).

Abb. 51



Aminopyrinmetabolismus
des Affenhirns

- — • — • Pyrimidon
- o — o — o 4-Aminoantipyrin
- x — x — x N-acetyl-4-aminoantipyrin

Der Aminopyrinmetabolismus untersucht mit Hilfe einer "in situ" Durchströmung des Gehirns einen Affen von 12,8 kg Körpergewicht. Blut im extrakorporalen Kreislauf (e.K.): 500 ml. Durchströmungsgeschwindigkeit des e.K.: 115 ml/min. Initiale Aminopyrinplasmakonzentration des e.K.: 86,5 μ g/ml (nach Benzi 1967).

β) In vitro Untersuchungen

An tierischen Leberhomogenaten wurde eine Fülle von Untersuchungen durchgeführt, die der genaueren Kenntnis von Lokalisation, Struktur und Wirkweise der Pyramidon demethylierenden Enzyme dienen. Einige grundlegende Ergebnisse, die wahrscheinlich auch für den Menschen von Bedeutung sind, sollen hier besprochen werden.

Ausgehend von der Erkenntnis, daß Leberhomogenate Pyramidon stufenweise über Monomethyl-4-aminoantipyrin zum 4-Aminoantipyrin demethylieren, gingen La Du und Mitarbeiter der Frage nach, welche Coenzyme am Pyramidonstoffwechsel beteiligt sind, und an welchen Zellstrukturen die wirksamen Enzyme lokalisiert sind. (La Du und Mitarbeiter, 1955). Wurden verschiedene Zentrifugatfraktionen der Kaninchenleber auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Monomethyl-4-aminoantipyrin in 4-Aminoantipyrin umzuwandeln, ergab sich folgendes Bild:

Tab. 11

	gebildetes 4-Aminoantipyrin (μ mol)
Gesamthomogenat	1,04
Überstand	1,45
Mikrosomen	0,05
wasserlösliche Fraktion des Überstands	0,05
Mikrosomen + wasserlösl. Frakt.	1,45

Die metabolische Einzelaktivität der Mikrosomen ist ebenso wie die der überstehenden, mikrosomenfreien Zentrifugatfraktion kaum nennenswert klein. Werden beide Fraktionen jedoch gemeinsam inkubiert, so steigt ihre Wirkung um nahezu den Faktor 30 an. Demnach wird der Arzneimittel-metabolismus von einem Enzymsystem katalysiert, das teils

in der Mikrosomenfraktion, teils in der wasserlöslichen Fraktion des Zentrifugat-Überstandes lokalisiert ist und daher erst beim Zusammengeben beider Zellelemente voll wirksam wird.

Da die in der mikrosomenfreien Fraktion enthaltenen, metabolisch aktiven Substanzen frei gelöst sind, schien es möglich zu sein, auch mit gewaschenen, in Pufferlösung aufgeschwemmten Mikrosomen eine desalkylierende Aktivität in Gang zu bringen, wenn es gelang, die fehlenden Stoffe zu substituieren (Tab. 12).

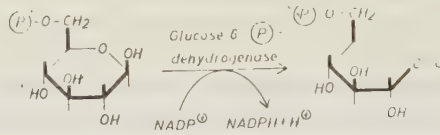
Tab. 12 Demethylierungsaktivität von Mikrosomen

	gebildetes 4-Aminoantipyrin (μ mol)
Mikrosomen + (dialysierte) wasser- lösliche Fraktion + NADP ⁺	2,21
Mikrosomen + NADP ⁺	0,12
Mikrosomen + NADP ⁺ + Glukose-6-phos- phatdehydrogenase	1,46
Mikrosomen + NADPH	0,90
Mikrosomen + NADH	0,0

(nach La Du und Mitarbeiter, 1955)

Als in der mikrosomenfreien Fraktion enthaltene Schlüsselsubstanz erwies sich dabei das NADPH (reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat). Wurde es den gewaschenen Mikrosomen zugesetzt, so erhöhte sich die Metabolismusrate des Monomethyl-4-aminoantipyrin um ein Vielfaches. Da NADP⁺ bei der Dehydrierung des Glukose-6-phosphat der Glukose-6-phosphatdehydrogenase als Coenzym dient und dabei zum NADPH reduziert wird (Abb. 52), ist auch die den Pyramidonmetabolismus fördernde Wirkung dieser Substanzen verständlich.

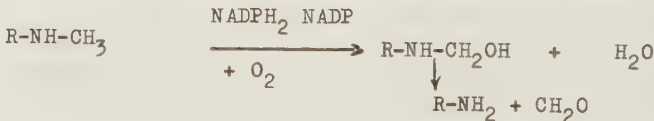
Abb. 52 Wirkweise der Glukose-6-P-Dehydrogenase



Auch die naheliegende Frage nach dem Verbleib des abgespaltenen C₁-Bruchstücks war relativ leicht zu beantworten. Die N-gebundene CH₂-Gruppe wird oxidativ abgespalten und lässt sich danach als Formaldehyd nachweisen. Bei in vitro Versuchen dient daher die Menge des gebildeten Formaldehyd als Indikator für die N-demethylierende Aktivität des untersuchten biologischen Substrats (La Du und Mitarbeiter 1955). Bei Untersuchungen über den Mechanismus dieser und ähnlich arzneimittelmetabolisch wirksamer Reaktionen gewann neben der als Elektronenübertrager fungierenden Cytochrom-c-reduktase zunehmend auch das Haemoprotein P-450 an Beachtung. Dieses Enzym vermag molekularen Sauerstoff zu binden und dabei in bisher noch nicht restlos gekläarter Weise unter Umsatz von zwei Reduktionsäquivalenten Hydroxylierungsreaktionen zu katalysieren. Diese Funktion lässt sich durch CO kompetitiv hemmen.

Auch die demethylierende Aktivität der Lebermikrosomen wird durch CO kompetitiv gehemmt. Außerdem geht diese Fähigkeit der Mikrosomenfraktion auch weithin mit dem Gehalt an P-450 parallel. Demnach ist also eine Beteiligung des P-450 an der N-Demethylierung des Aminopyrin anzunehmen. (Kato, 1966).

Dieser Vorgang lässt sich in folgendes Reaktionsschema fassen:



Derartige Korrelationen zwischen Arzneimittelabbau und Funktion von P-450 zeigten sich auch bei einer Reihe anderer Medikamente. Demnach sind möglicherweise auch die folgenden Reaktionen auf das allgemeine Prinzip einer Hydroxylierung durch P-450 zurückzuführen:

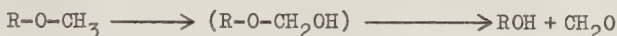
Aromatische Hydroxylierung:



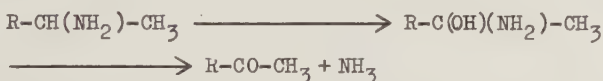
Alipathische Hydroxylierung:



O-Desalkylierung:



Desaminierung:



Sulfoxidation:



N-Oxidation:



Trotz vieler Überlegungen ist es bisher noch nicht gelungen, eine einwandfreie Vorstellung vom genauen Reaktionsablauf der Hydroxylierung zu gewinnen. Im Rahmen dieser Arbeit soll darauf verzichtet werden, auf die verschiedenen Modellvorstellungen näher einzugehen.

Im folgenden sei daher nur schematisch auf ein Modell verwiesen, das zur Zeit am besten durch experimentelle Studien untermauert zu sein scheint (Abb. 53).

α) Hydroxyantipyrinkonjugat

Im Jahr 1901 von Lawrow am Hundeharn gewonnene Ergebnisse wiesen auf ein Glukuronsäure-gepaartes Hydroxyantipyrin als Metaboliten hin. (Lawrow, 1901). Offen jedoch blieb die Frage, ob die Hydroxylgruppe an den Pyrazolonkern selbst oder an seinen Phenylrest gebunden ist.

Endgültige Klarheit hierüber brachte eine Untersuchung durch Brodie und Axelrod (1950), die damit die Grundlage für die heutige Kenntnis des Antipyrinmetabolismus schufen. Im über 48 Stunden hinweg gesammelten Urin von zwei Probanden, die je 1,0 g Antipyrin eingenommen hatten, stieg die Glukuronsäurekonzentration nach starkem Ansäuern und einstündigem Erhitzen wesentlich stärker an, als das bei Kontrollproben zu beobachten war.

Es gelang, den durch die Verseifung abgespaltenen Antipyrinmetaboliten auch selbst zu extrahieren und schließlich durch Vergleich mit synthetischen Bezugssubstanzen als 4-Hydroxyantipyrin zu identifizieren.

Weitere Versuche zeigten, daß beim Menschen 30 - 40 % des eingenommenen Antipyrin als 4-Hydroxyantipyrinkonjugat ausgeschieden werden. Ähnlich wie bei früheren Tierversuchen waren auch beim Menschen nur vernachlässigbar geringe Mengen des Metaboliten nicht an Glukuronsäure gekoppelt. Dieses Ergebnis wies darauf hin, daß Hydroxyantipyrin im Menschen nahezu quantitativ an Glukuronsäure gebunden wird. Die Schnelligkeit dieser Reaktion wird durch die Tatsache verdeutlicht, daß zu keiner Zeit freies 4-Hydroxyantipyrin im Plasma nachzuweisen war.

Die bei der Besprechung des Pyramidonstoffwechsels schon mehrmals zitierte Arbeit von Halberkann und Fretwurst (1950) geht auch kurz auf den Stoffwechsel des Antipyrin ein (Tab. 12). In einem Einzelversuch, bei dem eine Testperson an zwei Tagen jeweils 4 x 0,5 g Antipyrin einnahm, bestätigten sich im Wesentlichen die Resultate der Brodie'schen Untersuchung.

Tab. 12 Ergebnisse einer Untersuchung über den Antipyrin-Stoffwechsel

Nr.	Anti- pyrin	Harn ml (Farbe)	Drehung des mit Pb-Acetat geklärten Harns	Direkt aus sodaalkal. Lösung mit CHCl_3			Nach Kochen mit 2% HCl, aus sodaalkal. Lösg. mit CHCl_3	
				in HCl	in NaOH lösl.	neutral	in HCl lösl.	in NaOH lösl.
				Subst. F. 138 bis 140	Oxypan- tipyrin	Anti- pyrin	Subst. F. 138 bis 140	Oxyan- tipyrin
1	-	965 (nor- mal)	- 0,05 %	0,0090g	0,0031g	0,0181g	0,0086g	0,0167g
2	4xo, 5g	1540 (rötl. gelb)	- 0,2 %	0,0306g	0,0060g	0,0577g	0,0308g	0,3211g
3	4xo, 5g	1210 (rötl. gelb)	- 0,4 %	0,0669g	0,0086g	0,0691g	0,0511g	0,5497g
4	-	1000 (nor- mal)	- 0,15%	0,0340g	0,0034g	0,0272g	0,0262g	0,1521g
5	-	970 (nor- mal)	- 0,05%	0,0170g	0,0030g	0,0187g	0,0131g	0,0464g
Gesamt-Ausscheidung: Abzug für Blindwerte:				0,1575g 0,0450g	0,0241g 0,0155g	0,1908g 0,0905g	0,1298g 0,0430g	1,0860g 0,5635g
Rein-Ausscheidung:				0,1125g	0,0086g	0,1003g	0,0868g	1,0025g

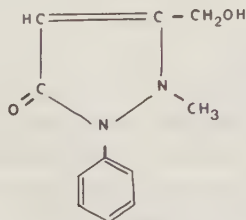
(nach Halberkann und Fretwurst, 1950)

Ca. 2,5 % der verabreichten Dosis wurden unverändert als Antipyrin, ca. 23 % als 4-Hydroxyantipyrinkonjugat wiedergefunden. Ein weiterer, bis dahin nicht isolierter Metabolit war in Wasser leicht löslich, färbte sich mit FeCl_3 braunrot und kristallisierte in Äther aus. Dabei bildeten sich "farnkrautartige", leicht gelbgefärbte Nadeln, deren Schmelzpunkt bei $139 - 140^\circ\text{C}$ lag. Identifiziert wurde die Substanz jedoch nicht.

β) 3-Hydroxymethyl-2-methyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on

Eine in vielen Eigenschaften auffallend ähnliche Verbindung isolierten 1968 Yoshimura und Mitarbeiter aus dem Harn von Mensch und Tier (Yoshimura, 1968). Sie konnte ebenfalls mit FeCl_3 sichtbar gemacht werden, kristallisierte in einem Chloroform-Äther-Gemisch aus und bildete dabei farblose Prismen, die bei $143 - 144^\circ\text{C}$ schmolzen. Die zusammenfassende Bewertung von Elementaranalyse, Infrarot- und NMR-Spektrogramm wies eindeutig darauf hin, daß es sich bei diesem Metaboliten um das 3-Hydroxymethyl-2-methyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on handelt.

Abb. 54



3-Hydroxymethyl-2-methyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on

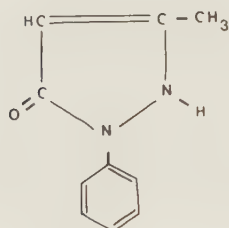
Angaben zur Menge des ausgeschiedenen, neuentdeckten Metaboliten sind in der Arbeit nur beiläufig zu finden. Die Autoren schreiben (Übersetzung aus dem Englischen):

"... Diese Verbindung repräsentiert unzweifelhaft einen der bedeutenderen Metaboliten im Urin der untersuchten Spezies und schien mehr in freier als in konjugierter Form ausgeschieden zu werden. Dies traf besonders beim Menschen und bei der Maus zu. ..."

γ) 1-Phenyl-3-methyl-3-pyrazolin-5-on-konjugat

Leider ebenfalls mengenmäßig nicht bestimmt wurde eine weitere Möglichkeit des menschlichen Organismus, Phenazon abzubauen. Schüppel gelang es (1966), nach Antipyringabe im Harn von Mensch und Tier einen N_2 -demethylierten Metaboliten des Mittels, das 1-Phenyl-3-methyl-3-pyrazolin-5-on nachzuweisen. Es wird in gebundener Form ausgeschieden und läßt sich mit β -Glukuronidase freisetzen. Einiges deutet darauf hin, daß es sich um das N-Glukuronid des Norphenazon handelt.

Abb. 55

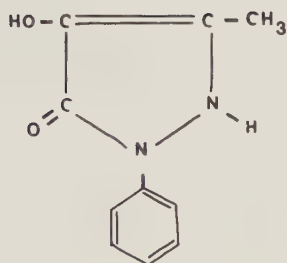


1-Phenyl-3-methyl-3-pyrazolin-5-on
(Norphenazon)

δ) Diketopyrazolin

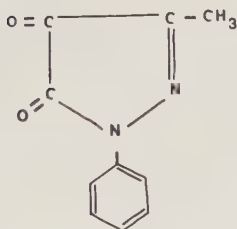
Das Auffinden eines N-demethylierten Antipyrimmetaboliten kann nach den Ergebnissen beim Pyramidon-Stoffwechsel kaum überraschen. An Interesse gewinnt die N_2 -Demethylierung durch ihre Kombination mit einer C_4 -Hydroxylierung. Die Dehydrierung des dabei entstehenden 1-Phenyl-3-methyl-4-hydroxy-3-pyrazolin-5-on führt schließlich zur Bildung von 1-Phenyl-3-methyl-4,5-dioxo-pyrazolin (Diketopyrazolin), welches im Hundeharn in freier Form, beim Menschen nur in gebundener Form nachzuweisen war (Wittmann, 1968). (Abb. 56-57)

Abb. 56



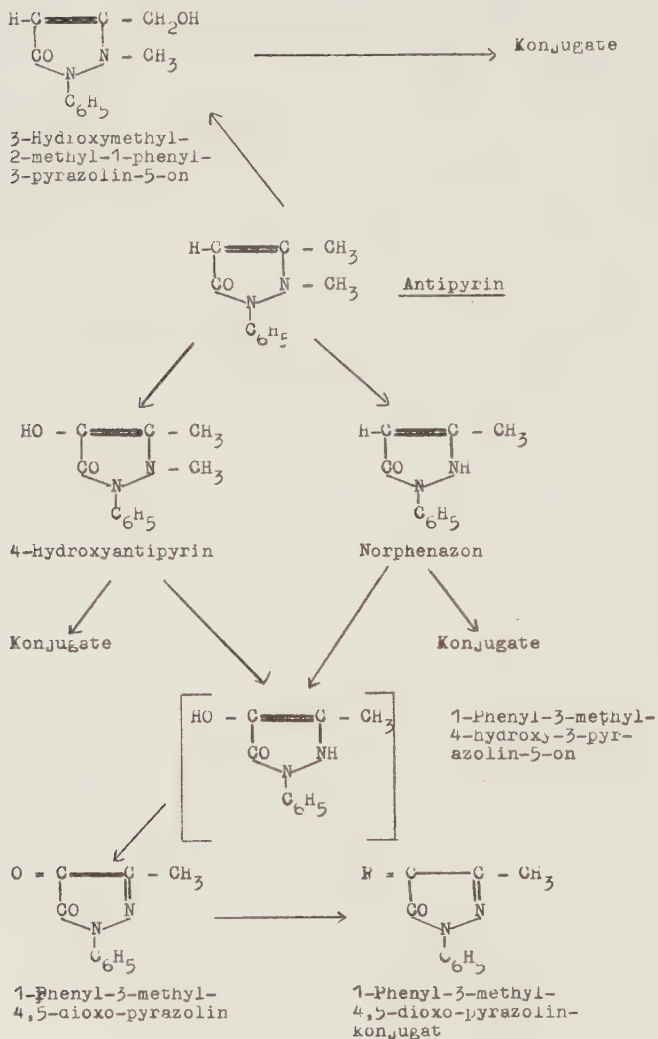
1-Phenyl-3-methyl-4-hydroxy-3-pyrazolin-5-on

Abb. 57



1-Phenyl-3-methyl-4,5-dioxo-pyrazolin

b) Metabolismus des Antipyrin aufgrund der
bisher im Harn nachgewiesenen Metaboliten:
eine Übersicht



c) zur Pharmakologie der Antipyrin-
metaboliten

Auffällig ist die Tatsache, daß die Antipyrinmetaboliten im Blut wenn überhaupt, dann nur in vernachlässigbar geringen Mengen nachzuweisen waren. Leider geht aus den Untersuchungsberichten nicht eindeutig hervor, ob dies für alle hier beschriebenen Phenazonstoffwechselprodukte zutrifft. Eine maßgebliche Beteiligung der gebildeten Antipyrinmetaboliten an der therapeutischen Wirksamkeit des Mittels erscheint jedoch in hohem Maße unwahrscheinlich. Nicht auszuschließen ist die Möglichkeit, daß Antipyrinmetaboliten Hapteneigenschaften besitzen, auf die allergische Nebenwirkungen zurückzuführen sind. Besonderes Interesse verdient in dieser Hinsicht das hochreaktive Diketopyrazolin, welches ja auch beim Pyramidonstoffwechsel auftritt und daher auch nach Pyramidoneinnahme beobachtete, allergische Reaktionen erklären würde.

d) Antipyrin-Halbwertszeit

Unabhängig von direkten Plasmakonzentrationsbestimmungen der Antipyrinmetaboliten lassen sich quantitative Angaben zum Antipyrinstoffwechsel aus der Geschwindigkeit ableiten, mit der die Plasmakonzentration des Mittels abnimmt.

In der Literatur werden durchschnittliche Halbwertszeiten von rund 10 Stunden für Antipyrin angegeben (Brodie, 1950; Sobermann, 1949; Wilbrandt, 1964; Vesell, 1968; O'Malley, 1970).

e) Untersuchungen zum Arzneimittelmetabolismus
anhand experimenteller Studien der
Antipyrin-Halbwertszeit beim Menschen

In den vergangenen Jahren wurde Antipyrin wiederholt zur Bestimmung arzneimittelmetabolischer Aktivitäten des Menschen herangezogen. Sein besonderer Vorzug für solche Untersuchungen liegt darin, daß es sich sehr gleichmäßig im gesamten Körper verteilt und nur zu 0 - 10 % an Plasma-eiweiß gebunden ist. (Shore, 1957; Sobermann, 1949).

Daher zeigen sich Änderungen von Enzymaktivitäten besonders schnell und deutlich in Änderungen der Antipyrin-Plasmakonzentration. Die Ausscheidungsmengen unveränderten Antipyrins bleiben dabei konstant gering.

In einer 1968 veröffentlichten Arbeit stellten Vesell und Page fest, daß der Antipyrinabbau, wie auch schon für Phenylbutazon beschrieben, statistisch hochsignifikant genetisch bestimmt ist. Beim Phenylbutazon ließ sich dies besonders gut deutlich machen, wenn die Versuchsreihe mit Probanden durchgeführt wurde, denen drei Tage lang Phenobarbital als Enzyminduktor verabreicht worden war. Dadurch wurden die Versuchspersonen, die sich vorher in verschiedenen Zuständen der Enzyminduktion und -repression befanden, in einen jetzt für alle vergleichbaren Zustand der Enzyminduktion gebracht. (Whittaker, 1970). Diese Vermutung der Autoren läßt sich indirekt auch durch die Untersuchungen mit Antipyrin bestätigen: Vesell und Page bestimmten 1969 bei 8 Zwillingspaaren den Einfluß einer Phenobarbitalbehandlung auf die Antipyrinhalbwertszeit. Erstes wichtige Ergebnis war die Erkenntnis, daß die nach Phenobarbitalbehandlung beobachtete Halbwertszeitverkürzung individuell sehr verschieden ist. Sie betrug zwischen 0 und 69 % der jeweiligen Ausgangshalbwertszeit.

Kann man nun beim Einzelnen Voraussagen machen, ob und wenn ja in welchem Umfang sein Antipyrinabbau durch Phenobarbital stimuliert wird? Es zeigte sich, daß die Halbwertszeitverkürzung bei den untersuchten Personen auch prozentual gesehen mit steigender Ausgangshalbwertszeit anstieg, d.h., je länger die Ausgangshalbwertszeit, desto größer die Phenobarbital-stimulierte Halbwertszeitverkürzung.

Dabei verringerte sich die Standardabweichung der durchschnittlichen Antipyrin-Halbwertszeit nach 14-tägiger Phenobarbital-Stimulierung um ca. 20 %, die individuellen Halbwertszeitunterschiede wurden also kleiner. Ob eine weitere Phenobarbitalbehandlung zu einer weiteren Vereinheitlichung der Antipyrin-Halbwertszeit geführt hätte, kann natürlich nicht gesagt werden.

In besonders hohem Maße korrelierte die phenobarbitalstimulierte Halbwertszeitverkürzung mit den genetischen Kriterien der Testgruppe: Während die Halbwertszeitverkürzungen innerhalb der genetisch identischen Zwillingspaare praktisch keine Unterschiede zeigten, waren die entsprechenden Differenzen bei dizygoten Zwillingen erheblich größer. Dieser genetische Einfluß auf die Phenobarbital-stimulierte Antipyrin-Halbwertszeitverkürzung konnte auch statistisch hochsignifikant gesichert werden (Versell, 1969).

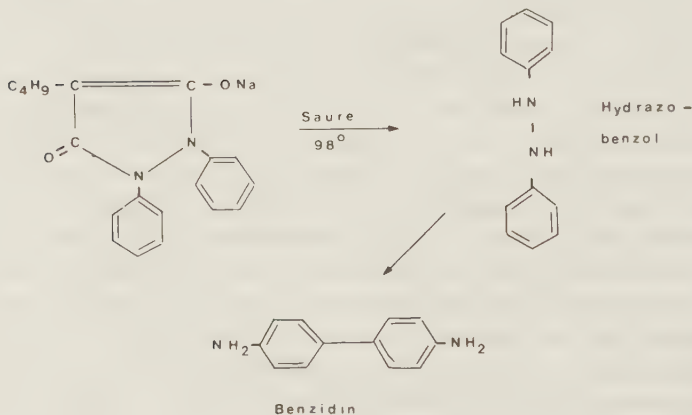
Auch das Alter des Menschen ist mitbestimmend für die Antipyrin-Halbwertszeit im Menschen. O'Malley (1971) untersuchte die Halbwertszeit von Antipyrin bei je einer Gruppe 20 - 50 jähriger Patienten einerseits (1) und 70 - 100 jähriger Patienten (2) andererseits. Die mittleren Antipyrin-Halbwertszeiten beider Gruppen unterschieden sich um rund 5 Stunden. ($T_{1/2}$ (1) = $12,0 \pm 3,5$ h, $n=61$; $T_{1/2}$ (2) = $17,4 \pm 6,8$ h, $n=19$; $p<0,01$). Die genauen Ursachen für die unterschiedliche Metabolisierungskapazität beider Gruppen sind bisher noch nicht geklärt.

Während der die Antipyrinhalbwertszeitbestimmende Effekt der Vererbung, die die Halbwertszeit modifizierende Wirkung des Alters und die medikamentbedingte Induktion arzneimittelabbauender Enzyme jetzt schon längere Zeit bekannt und auch bei anderen Medikamenten näher untersucht sind, eröffnet eine 1970 veröffentlichte Arbeit ein neues, weites Feld für experimentelle Studien. O'Malley fand, daß die Antipyrinhalbwertszeit bei 18 Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen, signifikant verlängert war im Vergleich zu 19 Kontrollpersonen (O'Malley, 1970). Die nach Östrogeneinnahme auftretende Zunahme des Gesamtkörperwassers und das dadurch vergrößerte Verteilungsvolumen allein vermögen diesen Befund nicht zu erklären. Am wahrscheinlichsten erscheint eine Abnahme der Antipyrinmetabolismusrate. Der genaue Wirkungsmechanismus ist bisher jedoch noch nicht geklärt. Es bleibt abzuwarten, ob sich dieser Befund auch beim Metabolismus anderer Substanzen nachweisen läßt.

G) NACHWEIS UND BESTIMMUNGSMETHODEN IN BIOLOGISCHEM MATERIAL

Die tierexperimentellen Untersuchungen mit G 13871, dem späteren Phenylbutazon, ergaben pharmakologisch so bedeutsame Resultate, daß man mit Nachdruck die Entwicklung eines Phenylbutazon-spezifischen Nachweisverfahrens vorantrieb, welches auch mit biologischem Material durchzuführen war und daher die Klärung der Pharmakokinetik des neuen, erfolgversprechenden Medikaments ermöglichen sollte. Erstes Ergebnis dieser Bemühungen ist eine 1950 von Pulver veröffentlichte, kolorimetrische Bestimmungsmethode, mit der das Phenylbutazon im Blut mit einer Fehlerbreite von $\pm 15\%$ (Angabe des Autors) nachweisbar ist. Die Methode verläuft nach dem in Abb. 59 angegebenen Reaktionsschema:

Abb. 59 Kolorimetrisches Bestimmungsverfahren für Phenylbutazon (Reaktionsschema)



Das Pyrazolidinderivat wird zu Hydrazobenzol verseift und zum Benzidin umgelagert. Das entstandene aromatische Amin kann leicht in Azofarbstoffe überführt werden, die kolorimetrisch bestimmbar sind. Wegen der langen Dauer des Nachweises und seiner geringen Spezifität - aromatische Amine im Blut machen das Ergebnis unbrauchbar (Sulfonamide) - wurde dieses Verfahren in der Praxis nur zu ersten, orientierenden Untersuchungen herangezogen.

Auch später von Moss (1954) und Tophoj (1958) unabhängig voneinander entwickelte Modifikationen des Pulver'schen Verfahrens konnten dessen erhebliche Mängel nicht beheben.

Spektrometrische Bestimmung von Phenylbutazon in biologischem Material (Burns 1953)

Eine wesentlich spezifischere, in modifizierter Form auch heute noch angewandte Phenylbutazon-Nachweismethode entwickelten 1953 Burns und Mitarbeiter. Aus dem angesäuerten biologischen Material wird Phenylbutazon in seiner Dicarboxylform in ein organisches Lösungsmittel (Heptan, Heptan mit Zusatz von 3 %igem Amylalkohol, Äthylenchlorid) extrahiert. In seiner Enolatform wird es aus dem Lösungsmittel in ein alkalisches Milieu übergeführt, wo es ohne weitere Umsetzung spektrophotometrisch bei 265 nm bestimmt wird.

Analysengang:

Plasma und Urin

In mit Glasstöpsel verschließbare Flaschen werden 1-3 ml Plasma oder Urin, 0,5 ml 3 N HCl und 20 ml Heptan gegeben. Inhalt 30 min schütteln; anschließend zentrifugieren. 15 ml der Heptan-Phase mit 5 ml 2,5 N NaOH versetzen und 5 min schütteln; anschließend Inhalt in einem Zentri-

fugenglas zentrifugieren. Durch Aspiration mit Pipette Entfernen der organischen Phase; ca. 3 ml der wässrigen Phase in Quarz-Küvette bei 265 nm spektrometrieren.

Gewebe

2 g Gewebe mit 10 ml Wasser in elektr. Homogenisator homogenisieren, 3 ml des Homogenates abpipettieren, Nachweis dann wie für Plasma und Urin beschrieben (s.o.), dabei jedoch statt 20 ml Heptan 30 ml Heptan verwenden, dem vorher bis zu 3 % Isoamylalkohol zugesetzt wurde. Nullpunktbestimmung mit Reagentienblindwerten.

Standardwerte: 1 ml einer passend verdünnten Standardlösung mit 4 ml 2,5 N NaOH zusammengeben. 50 µg Phenylbutazon ergeben optische Dichte von etwa 0,500. Dem Plasma zugesetzte Mengen von 10 - 100 µg werden zu 100 (± 3) % wiedergefunden.

In späteren Jahren zeigte es sich, daß dieses Verfahren zum Teil auch Phenylbutazonmetaboliten miterfaßt. Eine von Herrmann (1960) angegebene Modifikation des Burn'-schen Verfahrens gestattet die quantitative selektive Bestimmung von Phenylbutazon einerseits und der Summe der beiden bisher bekannten Metaboliten andererseits, mit einem mittleren Fehler von ± 10 %. Herrmann wählt als organisches Lösungsmittel Äthylenchlorid, mit dem Butazolidin und seine Metaboliten quantitativ extrahiert werden können. Die beiden Metaboliten werden dann mit einer gleichgroßen Volumenmenge m/15 Phosphatpuffer pH 8 aus dem Äthylenchlorid techn. selektiv ausgeschüttelt, das Phenylbutazon bleibt in der organischen Phase.

Die Menge des Phenylbutazon und seiner Metaboliten ergibt sich aus der Differenz der Extinktionen mit und ohne Phosphatpufferbehandlung des organischen Lösungs-

mittels. Weitere Modifikationen, im Prinzip der oben angegebenen ähnlich, finden sich in folgenden Arbeiten:

Fuchs 1965; Hvidberg 1968; Levi (1968) M.D. thesis, University of Cambridge zitiert nach Levi (1968), Stevens 1970. Gemeinsamer Nachteil all dieser Methoden ist, daß nicht in jedem Fall die Phenylbutazon-Spezifität einer Untersuchung gewährleistet ist, da viele saure Substanzen, insbesondere Barbiturate, in diesem Bereich des Spektrums absorbieren. Auch normale Gewebeteile absorbieren bei dieser Wellenlänge und können das Ergebnis verfälschen.

UV-spektrophotometrische Bestimmung von Phenylbutazon als Azobenzol (Wallace 1968)

1968 veröffentlichte Wallace eine ultraviolett-spektrophotometrische Phenylbutazonmethode, bei der dieser Nachteil weitgehend ausgeschaltet zu sein schien.

Das ähnlich wie bei Burns in die alkalische Lösung gebrachte Phenylbutazon wird nicht direkt bestimmt, sondern zunächst mit Kaliumpermanganat zu Azobenzol oxydiert, dessen Absorption dann schließlich zwischen 260 und 380 nm in Heptan gemessen wird (Maximum bei 314 nm). Untersuchungen auf Spezifität und Empfindlichkeit der Methode brachten folgende Ergebnisse:

Dem Vollblut in Mengen von 5 - 100 µg/ml zugesetztes Phenylbutazon wurde zu durchschnittlich 88,3 % wiedergefunden. Die in entsprechender Weise mit Harn durchgeführte Untersuchung führte zu einer Phenylbutazonwiedergewinnungsquote von 90,6 %. Etwa vorhandenes Oxyphenylbutazon beeinträchtigt die Effektivität der Methode nicht. Von 18 daraufhin untersuchten Medikamenten interferierte nur eines, nämlich Sulfinpyrazon, mit dem ange-

gebenen Phenylbutazonnachweis.

Analysengang:

5 - 10 ml bzw. g Blut, Urin, Mageninhalt oder homogenisiertes Gewebe mit 1 NHCl auf pH 1 ansäuern: Extraktion der Mischung mit 200 ml n-Heptan, evtl. auftretende Emulsion durch Zentrifugation beseitigen. Nach Trennung der beiden Phasen n-Heptan entfernen und mit 5ml 0,5 N NaOH extrahieren. 4 ml der wässrigen Lösung in 250 ml Rundbodenflasche übertragen, Zugabe von 20 ml 1 % Kaliumpermanganat in einer 0,4 M Natriumphosphat- 0,4 M Natriumhydroxidlösung (pH 12,4), 10 ml n-Heptan (spektrometrischer Güte). Flascheninhalt mit magnetischem Rührstab unter ständigem Rückfluß kochen. Nach dem Abkühlen das n-Heptan vom wässrigen Kaliumpermanganat trennen und mit 5 ml 0,5 N HCl-Lösung auswaschen. Bestimmung mit Spektrophotometer zwischen 260 bis 380 nm gegen eine n-Heptan Blindprobe. Wenn die Absorption bei einer einzelnen Wellenlänge bestimmt wird, Messung bei 314 nm. Je nach vermuteter Phenylbutazonmenge im Ausgangsmaterial kann Heptanmenge beim Oxydationsschritt ohne nachteilige Wirkungen zwischen 5 und 50 ml variiert werden.

Bestimmung von Oxyphenbutazon und γ -Hydroxyphenbutazon in biologischem Material

Da Oxyphenbutazon nach Untersuchungen von Burns und Mitarbeiter auch als Metabolit des Phenylbutazon auftritt, ist es zweckmäßig, Verfahren zu suchen, die eine selektive Bestimmung von Oxyphenbutazon auch in Anwesenheit von Phenylbutazon und seinen übrigen Abbauprodukten in biologischem Material ermöglichen. Die gemeinhin verwendeten Verfahren wurden für den klinischen Bedarf

entwickelt und verzichten auf eine chromatographische Auftrennung der verschiedenen Substanzen.

Spektrophotometrische Bestimmung von Oxyphenbutazon und γ -Hydroxyphenbutazon (Metabolit II) in biologischem Material sowie ihre Trennung aus Gemischen beider Substanzen im Urin mit Hilfe der Gegenstromverteilung (Burns 1955)

Prinzip:

Werden die beiden Phenylbutazonmetaboliten einzeln verabreicht, können sie im Plasma nach der schon für Phenylbutazon beschriebenen Methode (Burns 1953, s.o.) bestimmt werden. Dabei wird anstelle von Heptan Äthylendichlorid als Extraktionsmittel verwendet, und die Extinktion wird bei 255 nm bzw. 262 nm gemessen.

Quantitative Bestimmung der Phenylbutazonmetaboliten Oxyphenbutazon und γ -Hydroxyphenbutazon im Harn nach peroraler Phenylbutazonapplikation:

Beide Phenylbutazonmetaboliten werden wie oben angegeben aus dem angesäuerten Harn in Äthylendichlorid extrahiert. Die extrahierten Substanzen können nun in einem Gegenstromverteilungs-Verfahren isoliert und mengenmäßig bestimmt werden.

Quantitativer Nachweis der beiden bisher bekannten Phenylbutazonmetaboliten im Plasma (Herrmann 1960)

Dieses Verfahren gestattet, die Summe der bisher bekannten Phenylbutazonmetaboliten (Oxyphenbutazon und γ -Hydroxyphenbutazon) bei Anwesenheit von Phenylbutazon quantitativ zu erfassen. Das Verfahren wird bei den Nachweismethoden für Phenylbutazon besprochen (s. Seite 88).

Chromatographische Nachweismethoden für Phenylbutazon und seine Metaboliten.

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Phenylbutazon und Oxyphenbutazon in Körperflüssigkeiten (Finger 1965).

Finger benutzt die angegebenen Steigmittel bzw. Farbreakagentien. (Tab. 13 und 14).

Tab. 13 Steigmittel

Sämtliche Steigmittel p.a. *Merck*
Platten Kieselgel G : Aqua dest. = 1 : 2 (in g)
Schichtdicke 2 mm
30° bei 120° C aktiviert

Steigmittelgemisch	Laufzeit in min.	Laufstrecke in cm	Rf. PB	Rf. OB
1. $C_4Cl_4 : CH_3OH = 8 : 2$		10	0,6	0,5
2. $C_4Cl_4 : CH_3CH_2OH = 7 : 3$	76	10	0,95	0,58
3. a) $CH_2ClCH_2Cl : CH_3OH = 8 : 2$	44	10	0,95	0,35
b) $CH_2ClCH_2Cl : CH_3OH = 11,7 : 1,3$	40	10	0,8	0,5
4. $CHCl_3 : O = C \begin{smallmatrix} CH_3 \\ \\ CH_2 \end{smallmatrix} : CH_3COOH$ (Eisessig) = 7 : 2 : 1	134	15	0,86	0,7

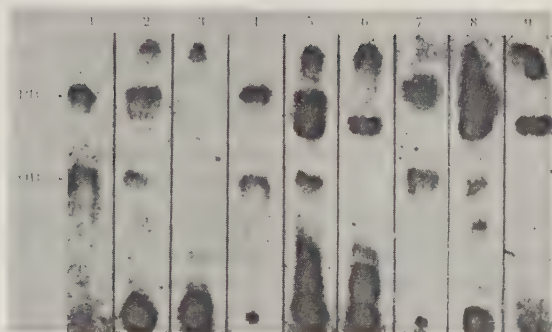
Tab. 14 Farbreaktionen

	OB	PB
1. $P_2O_5 \cdot 24 MoO_3$ in CH_3OH gesättigt, gesprayed, trocken und jeweils nur		
a) + konz. HCl	hellgrün und dunkelblau	
b) + Na_2CO_3 (20% Aqua dest.)	beide blauviolett	
c) + KOH gesättigt	blauviolett	
2. Na_2CO_3 20% wäbr. (wenig) trocknen + Folin- Ciocalteu-Reagenz (1 : 2 CH_3OH , gefiltert) leicht trocknen (Mitteilung Geigy-Lab.), bis 0,1 γ Fleck!	hellblau	violett, bei größerer Hitze rotviolett
3. Folin-Ciocalteu-Reagenz + 20% Na_2CO_3 + H_3PO_4 (65% 1 : 3 Aqua dest.)	gelb	violett
4. H_3PO_4 (65% 1 : 3 Aqua dest.) 10' bei 120° C	gelb	rotbraun
5. Wenig H_3PO_4 (65% 1 : 3 Aqua dest.) + Nitro- prussit Natrium in 1 n NaOH gesätt.; erhitzen	goldgelb	gelb
6. 65% H_2SO_4 + gesätt. NH_4VO_3 wäbr.	leuchtend gelb	leicht violett, stärkere Hitze bräunlich
7. $SbCl_3$ in Eisessig gesätt.		beide gelborange

Abkürzungen: PB = Phenylbutazon, OB = Oxyphenylbutazon
Sämtliche Reagenzien wurden gesprayed, sie waren alle p.a. *Merck*

Ergebnisse

Abb. 61



Jeweils 1 ml Urin, Galle, Plasma nach Ansäuern mit 0,5 ml 3 n HCl mit 20 ml $\text{CH}_2\text{Cl}-\text{CH}_2\text{Cl}$ extrahiert. Zum Trocknen eingeeengt, in CH_3OH gelöst aufgetragen.

Steigmittel 3,b), Färbung 2.

Spalte	1,4,7	2	3
aufgetragen	10 μg OB+PB	Urin mit 10 μg OB + PB	Urin leer

Spalte	5	6	8	9
aufgetragen	Galle mit 10 μg OB+PB	Galle leer	Plasma mit 10 μg OB+PB	Plasma leer

Bei Vergleich der Fleckgröße (entsprechend 10 μg /Fleck) ergibt sich, daß eine annähernd quantitative Extraktion stattfindet.

In einem Einzelversuch wurde nun nach Oxyphenbutazon-Einnahme aufgefangener Harn in der beschriebenen Weise dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt, dabei ergab sich das in Tab. 15 wiedergegebene Bild.

Tabelle 15 Dünnschichtchromatographische Untersuchung eines Harnes nach Oxyphenbutazon-Einnahme

Metabolitfraktionen

1. Steigmittel 4, Laufstrecke: 50 cm, schräg absteigend (Winkel 27°) für den CH₂Cl₂-Extrakt

		Fraktion bei			
		0,5 - 5 cm	5 - 5,5 cm	3 - 9 cm	33-34 cm (OB)
Färbung 4	gelb		gelb	gelb	gelb
Färbung 7	schmutzig braun		rotbraun	orange- braun	orange- braun

		Fraktion bei	
		36 - 39 cm	41 - 43 cm
Färbung 4	gelb		gelb
Färbung 7	orange		orange

Papier- und dünnschichtchromatographischer Nachweis von Phenylbutazon und seinem Metaboliten Oxyphenbutazon in einem Kaninchenlebermikrosomenpräparat

Leybold, 1962

Nach Stoppen des Ansatzes durch Methanol, anschließendem Zentrifugieren, Dekantieren und Zugabe von Wasser befinden sich Phenylbutazon und seine Metaboliten in einer 50 %igen methanolischen Lösung. Diese wird mit 1/100 Volumenteile 6 N H₂SO₄ angesäuert und dreimal mit 1/7 Volumenteile Petroläther (Siedebereich 40 - 70 °C) zum Entfernen von Lipoiden und Phenylbutazon geschüttelt. Die Phenylbutazonmetaboliten werden dadurch nicht extrahiert. Der Petroläther wird dann verworfen, die Phenylbutazonmetaboliten werden durch mehrmaliges (3x), minutenlanges Schütteln mit 1/10 Volumenteile Chloroform extrahiert. Dieses wird einmal mit Wasser gewaschen, dann mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und schließlich im Dünnschichtverdampfer bei 0 - 5 °C entfernt. Der verbleibende Rückstand wird wieder in wenig Chloroform gelöst und zur Chromatographie verwendet.

Dünnschichtchromatographie:

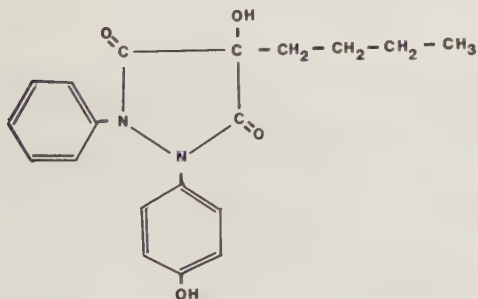
Material: Kieselgel
 Laufmittel: Chloroform, Toluol, 96 %iger Eis-
 essig (55:30:15)
 Laufzeit: 1 1/2 Stunden
 im Dunkeln, bei Zimmertemperatur.
 Färbemethode: Mit 1:3 verdünntem Folinreagens be-
 sprühen, trocknen und mit 1 N NaOH
 besprühen, bis Gelbfärbung verschwin-
 det.

Papierchromatographie:

Material: Schleicher und Schüll Papier 2043 b mgl.
 in 2,5 cm breiten Streifen, 24 Std. ge-
 wässert, dann luftgetrocknet.
 Imprägnation: Einmal durch 5 %iges Propylenglykol in
 Aceton gezogen und solange bewegt, bis
 Aceton verdunstet ist.
 Laufmittel: Toluol, 96 %iger Eisessig, Wasser
 (70:30:2).
 Laufzeit: 6 Std.
 bei Zimmertemperatur, im Dunkeln, unter
 Stickstoff.
 Detektion: Monochromatisches, kurzwelliges UV-Licht,
 Kontaktphotographie.

Oxyphenbutazon autoxydiert an der Luft zu 1-Phenyl-2-(p-hydr-
 oxyphenyl)-3,5-dioxo-4n-butyl-pyrazolidin (4-OH-P)

Abb. 62



1-Phenyl-2-(p-hydr-
 oxyphenyl)-3,5-dioxo-
 4n-butyl-
 pyrazolidin
 (4-OH-P)

Soll diese Verbindung eluiert werden, kann die Imprägnierung mit Propylenglykol unterbleiben. Die polaren Derivate wandern dann schneller (Rf 4-OH-P: ca. 0,5).

Ergebnisse:

Färbung (Dünnschichtchromatographie):

Mit dem verwendeten Folin-Reagens geben 50 μg Phenylbutazon einen schwachen blauen, 20 μg Oxyphenbutazon einen intensiv blauen und 20 μg 4-OH-P einen grünlichen Fleck. Nachweisgrenze für Oxyphenbutazon: 2 μg

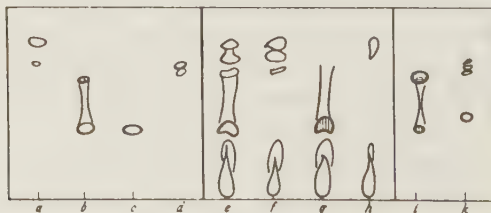
Rf-Werte sind den Chromatogrammen (Abb. 63 und 64) zu entnehmen:

Abb. 63



Abb. 63 a u. b. Papierchromatographie von Phenylbutazonderivaten (vgl. Text). a. Authentische Substanzen. I. 4-OH-P (Erklärung s. Text); II. p-Hydroxyphenylbutazon; III. γ -Hydroxyphenylbutazon; IV. Phenylbutazon. b. Extrakt aus Phenylbutazoninkubation mit Mikrosomen

Abb. 64



Text zu Abb. 64 auf S. 98

Dünnschichtchromatographie von Phenylbutazonderivaten (vgl. Text). a. Authentisches Phenylbutazon; b. Authentisches p-Hydroxyphenylbutazon; c. Authentisches "4-OH-P" (Erklärung s. Text); d. Authentisches γ -Hydroxyphenylbutazon; e. Extrakt aus Phenylbutazoninkubation mit Mikrosomen; f. Extrakt aus Gemisch von denaturierten Mikrosomen und Phenylbutazon; g. Extrakt aus Gemisch von denaturierten Mikrosomen und p-Hydroxyphenylbutazon; h. Extrakt aus denaturierten Mikrosomen; i. Rechromatographie des Fleck II (s. Abb. 63b); k. Rechromatographie des Fleck X (s. Abb. 63b).

Das von Burns beschriebene γ -Hydroxyphenylbutazon (Metabolit 2) konnte nicht gefunden werden; stattdessen wurde eine Substanz mit etwas niedrigerem Rf-Wert als authentischer Metabolit 2 gefunden. Sie ist demnach polarer als γ -Hydroxyphenylbutazon. Die Struktur dieser Verbindung wurde nicht geklärt.

Eine Bestimmungsmethode für Phenylbutazon und seine Metaboliten, die es gestattet, die gesuchten Substanzen quantitativ aus Harn, Plasma oder Geweben zu extrahieren und im Anschluß daran in einfacher Weise ohne wesentliche Störung durch mitextrahierte Substanzen chromatographisch zu bestimmen, ist unseres Wissens nach bisher noch nicht veröffentlicht worden. Ein solches Verfahren wäre im Hinblick auf die bisher nur mangelhaft bekannte Phenylbutazonstoffwechselbilanz (s.o.) höchst wünschenswert.

Nachweis von Aminopyrin und seinen Metaboliten in biologischem Material

Isolierung von Rubazonsäure und quantitative Wiedergewinnung von 4-Acetylaminoantipyren und 4-Aminoantipyren aus dem Harn gesunder Versuchspersonen (Halberkann, 1950).

Isolierung von Rubazonsäure:

Extraktion des bei der Klärung des Harns mit Bleiacetat durch ein Talkumfilter abgesaugten und mit Wasser gut gewaschenen Bleiniederschlages mit heißem Alkohol oder Essigester. Aus dem mit Natriumsulfat von Wasser befreiten und auf ein kleines Volumen eingeeengten Lösungsmittel kristallisiert die Rubazonsäure in feinen, roten Nadeln.

Quantitative Wiedergewinnung von 4-Acetylaminoantipyrin und 4-Aminoantipyrin (modifiziertes Stas-Otto Trennungungsverfahren):

Der Harn wurde gegebenenfalls mit Essigsäure angesäuert und mit 2 % gepulvertem Bleiacetat versetzt, dann wurde durch ein Talkumfilter filtriert, und "das mit 3 % Kristallsoda versetzte Filtrat nach deren Lösung wieder durch Talkum gesaugt. Nach dem Auflösen von 33 % NaCl wurde das Filtrat (1500 ml) 7-mal mit je 200 ml Chloroform extrahiert." Die vereinigten Chloroform-Extrakte wurden nach dem Trocknen mit Natriumsulfat abdestilliert und der chloroformfreie Rückstand in 20 ml warmen Wassers aufgenommen. Nach dem Erkalten wurde wenig Talkum zugesetzt, in einem Scheidetrichter filtriert und das Filter gewaschen. Das Filtrat wurde mit 40 Tropfen 25-%iger Salzsäure angesäuert und 4-mal mit je 30 ml Äther ausgeschüttelt. Die in einem zweiten Schütteltrichter gesammelten Ätherextrakte wurden 2-mal mit je 5 ml Wassers (das vorher zum nochmaligen Nachwaschen des Filters benutzt war) gewaschen. Das Wasser wurde der mit Äther gereinigten, salzsauren Lösung zugefügt.

Nach Zusatz von 15 g Kochsalz wurde 5-mal mit je 100 ml Chloroform ausgeschüttelt: Rückstand der Chloroformphase = Acetylaminoantipyrin (A). Dann wurde die Lösung mit 90 Tropfen 15 %iger Natronlauge alkalisiert und wieder 5-mal mit je 100 ml Chloroform extrahiert: Rückstand der Chloroformphase = Aminoantipyrin (B).

Die Chloroform-Rückstände wurden bei 100° C getrocknet. Es fanden sich 98,9 % des dem Harn zugesetzten Acetylaminoantipyrins und 97,7 % des dem Harn zugesetzten Aminoantipyrins wieder.

(100 % Acetylaminoantipyrin = 1,0 g;
100 % Aminoantipyrin = 0,2 g)

Spektrometrische Bestimmung von Pyramidon, 4-Aminoantipyrin und N-acetyl-4-aminoantipyrin in biologischem Material (Brodie, 1950).

Prinzip:

Bestimmung von Pyramidon:

Das biologische Material (Plasma, homogenisierte, in Wasser emulgierte Organgewebe oder Faeces) wird bei alkalischem pH in Äthylendichlorid überführt; das dabei ebenfalls extrahierte N-Acetyl-4-aminoantipyrin wird mit 0,2 M Natriumborat ausgewaschen; im Anschluß daran wird das Pyramidon zusammen mit dem ebenfalls in Äthylendichlorid übergegangenen 4-Aminoantipyrin in Säure überführt und bei 260 nm. wird spektrophotometrisch die Extinktion der gelösten Substanzen bestimmt. Da Pyramidon und 4-Aminoantipyrin bei 260 nm nahezu identische molare Extinktion zeigen, ergibt sich die Pyramidonkonzentration durch Subtraktion der colorimetrisch erhaltenen 4-Aminoantipyrinkonzentration (s.u.) von der Gesamtkonzentration beider Verbindungen. Nach Korrektur der gefundenen Werte um den prozentualen Verlust bei Vergleichsstandards wurde dem Harn zugesetztes Pyramidon zu 98 ($\pm$ 5) % wiedergefunden.

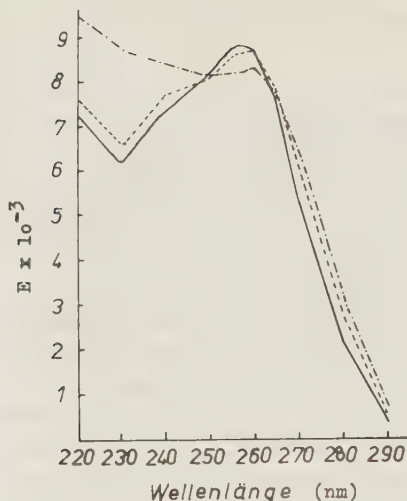
Bestimmung von 4-Aminoantipyrin:

4-Aminoantipyrin wird bei alkalischem pH in Chloroform übergeführt und dann in Säure gebracht (0,5 N HCl). Es wird diazotiert und mit α -Naphthol gekuppelt. Die dadurch gewonnene Verbindung wird in eine geringe Menge Isoamyl-Alkohol extrahiert und bei 540 nm in einem Spektrometer bestimmt. Bei der Bestimmung größerer Mengen (10 mg oder mehr), die im Urin oder gelegentlich im Plasma gefunden werden, kann die Extinktion oder Verbindung direkt in der wäßrigen alkalischen Lösung bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt werden. Nach Korrektur der gefundenen Werte um den prozentualen Verlust bei Vergleichsversuchen wird dem Harn zugesetztes 4-Aminoantipyrin zu 96 ($\pm$ 5) % wiedergefunden.

Bestimmung von N-Acetyl-4-aminoantipyrin

N-Acetyl-4-aminoantipyrin wird aus dem biologischen Material durch Extraktion in Chloroform isoliert (pH 5 oder größer). Die Extraktion wird durch Sättigung der wäßrigen Phase mit NaCl erhöht. Das Chloroform wird verdampft, der Rückstand in Säure aufgenommen. N-Acetyl-4-aminoantipyrin wird hydrolysiert, das entstehende 4-Aminoantipyrin wie oben beschrieben bestimmt. Enthält das untersuchte biologische Material auch 4-Aminoantipyrin (Untersuchungsgang s.o.), muß dies bei der Berechnung der N-Acetyl-4-aminoantipyrinkonzentration berücksichtigt werden. Nach Korrektur der gefundenen Werte um den prozentualen Verlust bei Vergleichsversuchen wird dem Harn zugesetztes N-Acetyl-4-aminoantipyrin zu 98 ($\pm$ 5) % wiedergefunden.

Abb. 65



Die Absorptionsspektren von Pyramidon (durchgehende Linie), 4-Aminoantipyrin (gestrichelte Linie) und N-acetyl-4-aminoantipyrin (Strich-Punkt-Strich Linie) in 0,1 NHCl. E ist die molare Extinktion (Brodie, 1950, Fate of Pyramidon)

Extraktion, papierchromatographische Trennung und Identifizierung von Aminophenazon (bessere Bezeichnung: Aminoantipyrin) (A), 4-Methylaminoantipyrin (MAA), 4-Methylacetyl-aminoantipyrin (MAAA), 4-Aminoantipyrin (AA), Acetylaminoantipyrin (AAA), 4-Hydroxyantipyrin (HA), Rubazonsäure (RS) und Methylrubazonsäure (MRS). (semiquantitativ).

(nach Vercerkova und Mitarbeiter 1966a, 1966b, 1967)

Zahl der Versuchspersonen: 2 (+ 160 Vergiftungsfälle)

Dosierung: 1 mal 0,3 g Aminophenazon
Harn über 24 Std. nach Pyramidoneinnahme
gesammelt

Extraktion:

Vorversuche:

Zu 25 ml Normalharn je 1 mg Testsubstanz gegeben. Mit HCl auf pH 2-3 angesäuert und zweimal mit der doppelten Menge Äther ausgeschüttelt. Vereinigte Ätherauszüge über Na_2SO_4 getrocknet. Abdampfen des Lösungsmittels: Rückstand E_S . Die gleiche Harnprobe dann mit Soda alkalisiert (pH 10), erneutes Ausschütteln mit Äther, Rückstand (E_A).

Eine zweite Serie mit Chloroform ausgeschüttelt (saurer Extraktionsrückstand = CH_S , alkalischer Rückstand = CH_A).

In weiterer Serie wurden HA, MAAA, AAA, RS, MRS (alle nicht ausgeprägt basisch) in gleicher Weise zuerst im basischen, anschließend im sauren Milieu extrahiert.

Rückstände nach Abdampfen (s.o.) in 0,5 ml Äthanol (RS in Chloroform) gelöst, Mengen von 0,0075 ml papierchromatographiert. Entwicklungssystem: Formamid/Benzol; Färbung der farblosen Metaboliten: Dragendorff.

Ergebnisse:

Tab. 15

Substanz	Extraktions- folge	Ätherextrakte		Chloroformextrakte	
		E_S	E_A	CH_S	CH_A
A	a	-	+	+	+
MAA	a	-	+	-	+
AA	a	-	+	-	+
MAAA	a	-	S	+	S
	b			S	+
AAA	a	-	S	+	S
	b			S	+
HA	a	+	S	+	S
	b	S	+	S	+
MRS	a	+	S	+	S
	b	S	+	S	+
RS	a	+	S	+	S
	b	S	+	S	+

E_S Äther (sauer); E_A Äther (alkalisch); CH_S Chloroform (sauer); CH_A Chloroform (alkalisch)

- negativ, S Spuren, + Hauptmenge;

a Extraktion zuerst aus saurer Lösung, b Extraktion zuerst aus alkalischer Lösung.

Vecerkova und Mitarbeiter 1967)

Hauptversuch:

Harn bei alkalischer Reaktion (Soda pH 10) mit Chloroform extrahieren; Chloroform abdampfen; Extrakte (CH_A) werden zur chromatographischen Isolierung der einzelnen Metaboliten verwendet.

Isolierung:

Methode: Papierchromatographie; Papier Whatman 1

Sichtbarmachung und Farbreagentien:

- 1) Dragendorff-Reagens
- 2) 1 %ige, wäßrige Gold (III)-chloridlösung
- 3) 2 %ige, wäßrige Eisen (III)-chloridlösung
- 4) Cer(IV)-sulfatlösung (1 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ in 2 n H_2SO_4)
- 5) p-Dimethylaminobenzaldehydreagens
- 6) Pauly-Reagens (modifiziert nach Kutacek; aus Hais und K. Macek, 1963)
- 7) UV-Lichtabsorption mit Niederdruck-Hg.Lampe mit Chlorfilter bei 254 nm.
Kopien auf Reflex-Foma-Papier im Kontakt-abdruckverfahren.

Farbreaktionen:

Tab. 16

Sub- stanz	UV 254 nm	Sichtbarmachung Dragen- dorff- Reagens	AuCl_3	FeCl_3	$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	p-DMAB	Pauly- Rea- gens
A	+	O	Gr	BV	-	G schwach	OBr
MAA	+	O	Gr— V	KR	R	G	KBr
AA	+	O	Gr— V	K	R	GO	KBr
MAAA	+	O	-	OBr	-	-	-
AAA	+	O	Gr	Br	-	-	-
HA	+	O	Gr	-	-	-	-
MRS	+	O	OBr—	kV—	versch.	G	kV
RS	+	O	versch. kV	versch. kV	versch. kV	kV	K

O orange, Gr grau, V violett, K karminrot, R rosa, B blau,
G gelb, Br braun, kV keine Veränderung, — negativ,
+ positiv, versch. verschwindet

(Vecerkova und Mitarbeiter 1967)

Identifizierung:

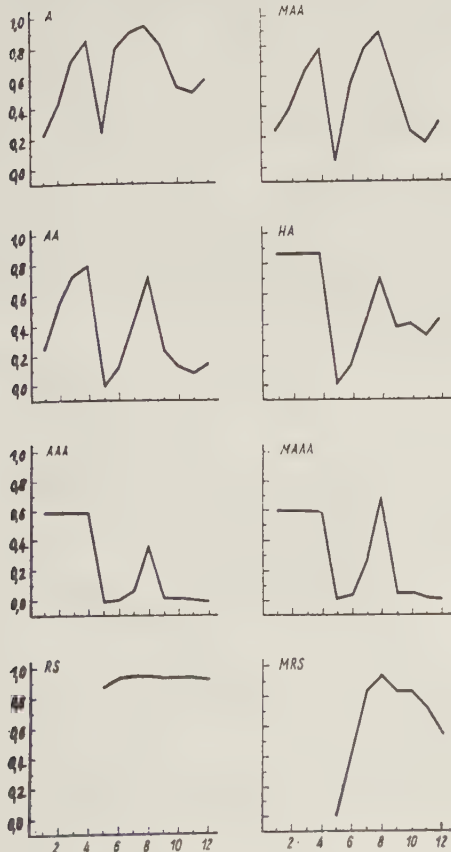
Vergleichschromatogramme mit synthetisierten Testsubstanzen
(Vorversuche)

- 1) Abhängigkeit des R_f -Wertes vom pH-Wert
- 2) Abhängigkeit des R_f -Wertes von der Polarität der mobilen Phasen
- 1) + 2) ermöglichen, "chromatographische Spektren" aufzustellen (Abb. 66).

Abb. 66

3) "Chromatographische Spektren" der Abbauprodukte des Aminphenazons

R_F



Nummer des
Fließmittels

- 1 pH 1,95/Butanol
- 2 pH 2,85/Butanol
- 3 pH 3,95/Butanol
- 4 pH 5,00/Butanol
- 5 Formamid/Cyclohexan
- 6 Formamid/Cyclohexan-Chloroform (7:3)

- 7 Formamid/Cyclohexan-Chloroform (5:5)
- 8 Formamid/Cyclohexan-Chloroform (3:7)
- 9 Formamid/Benzol
- 10 Formamid/Ameisensäure/Benzol
- 11 Formamid/Ameisensäure/Benzol-
- 12 Formamid/Äthyläther

(Vecerkova und Mitarbeiter 1966a, b, c)

- 4) Die folgende tabellarische Übersicht über die Wanderungsgeschwindigkeiten in den verschiedenen Laufsystemen gibt gezielt die günstigsten R_f-Werte aller untersuchten Stoffe wieder.

Tab. 17

System	R _f W e r t e							
	A	MAA	AA	MAAA	AAA	HA	MRS	RS
pH 1,95/BuOH ⁺)	0,23	0,24	0,26	0,59	0,59			
pH 2,85/BuOH ⁺)	0,45	0,40	0,55	0,59	0,59			
pH 3,95/BuOH ⁺)	0,73	0,65	0,73	0,59	0,59			
f/C	0,23							
f/C-CH (9:1)	0,53	0,17					0,09	
f/C-CH (8:2)	0,70	0,36					0,24	
f/C-CH (7:3)	0,80	0,55	0,13			0,13	0,47	
f/C-CH (6:4)		0,69	0,25	0,10		0,23	0,69	
f/C-CH (5:5)		0,80	0,44	0,27		0,40		
f/C-CH (4:6)			0,60	0,50	0,18	0,56		
f/C-CH (3:7)			0,73	0,69	0,37	0,71		
f/C-CH (2:8)					0,54	0,78		
f/C-CH (1:9)					0,67			
f/B	0,81	0,56	0,23			0,38		
f ₇ -F/B	0,53	0,23	0,13			0,42		
f ₇ -F/B-C(7:3)	0,50	0,16				0,33	0,72	
f/E	0,60	0,32	0,14			0,45	0,54	
f/T	0,67						0,37	
DMF _T /C	R _A 1,00	R _A 0,4				R _A 0,2		R _A 0,8
DMF _T -NH ₃ /C	R _A 1,00	R _A 0,4				R _A 0,2		R _A 0,2

R_A-Werte: Die Wanderungsgeschwindigkeit der Substanzen wurde auf die des Aminophenazons bezogen.

f/B: Formamid/Benzol

Zur Imprägnierung wurde eine 20 %ige äthanolische Formamidlösung benutzt; der pH-Wert dieser Lösung betrug 7,35
Mobile Phase: Benzol

f-F/B: Formamid-Ameisensäure/Benzol

Zur Imprägnierung wurde eine 20 %ige äthanolische Formamidlösung mit 0,5 Vol.-% 85 %iger Ameisensäure verwendet; der pH-Wert der Lösung war 4,3. Es ist empfehlenswert, die Lösung nach 2 d frisch zu bereiten.
Mobile Phase: Benzol

f-F/B-C: Formamid-Ameisensäure/Benzol-Cyclohexan

Imprägnierung vgl. oben.

Mobile Phase: Benzol/Cyclohexan (7 : 3)

Es wurde in ungesättigten Kammern entwickelt.

Die Entwicklungsmenge der mobilen Phase betrug 30 ml.

f-C-CH: Formamid-Cyclohexan-Chloroform

f/E: Formamid-Äthyläther

Imprägnierung: vgl. Formamid/Benzol.

Mobile Phase: Äthyläther (diphenylaminofrei).

Temperatur bei der Entwicklung: 15°C

f/T: Formamid/Tetrachlormethan

Imprägnierung: vgl. Formamid/Benzol

Mobile Phase: Tetrachlormethan

f-F/T: Formamid-Ameisensäure/Tetrachlormethan

Imprägnierung: vgl. Formamid-Ameisensäure/Benzol.

Mobile Phase: Tetrachlormethan

DMF_r/C: Dimethylformamid/Cyclohexan

Zur Imprägnierung wurde eine 40 %ige äthanolische Dimethylformamidlösung benutzt, deren pH-Wert 10 betrug.

Mobile Phase: Cyclohexan

Unmittelbar nach der Imprägnierung wurde auf einer Länge von 30 cm und im Durchlauf (15 h) entwickelt. Bei letztem wurde die Wanderungsgeschwindigkeit der Metaboliten auf Aminophenazon bezogen (R_A)

DMF_n-NH₃/C: Dimethylformamid-Ammoniak/Cyclohexan

Imprägnierung: vgl. Dimethylformamid/Cyclohexan, unter Zusatz von 1 Vol.-% konz. Ammoniaklösung. Der pH-Wert dieser Lösung betrug 11,6. Die Entwicklung erfolgte gleich nach der Imprägnierung im Durchlauf (20 - 24 h) mit Cyclohexan.

DMF_n-F/C: Dimethylformamid-Ameisensäure/Cyclohexan

Für die stationäre Phase wurde eine 40 %ige äthanolische Dimethylformamidlösung benutzt, deren pH-Wert 7,35 betrug. Zu dieser Lösung wurde 1 Vol.-% 85 %ige Ameisensäure zugesetzt. Der pH-Wert wurde durch eventuelle Zugabe von weiterer Ameisensäure auf 5,0 eingestellt. Die Papier wurden gleich nach der Imprägnierung auf einer Länge von 30 cm mit Cyclohexan entwickelt.

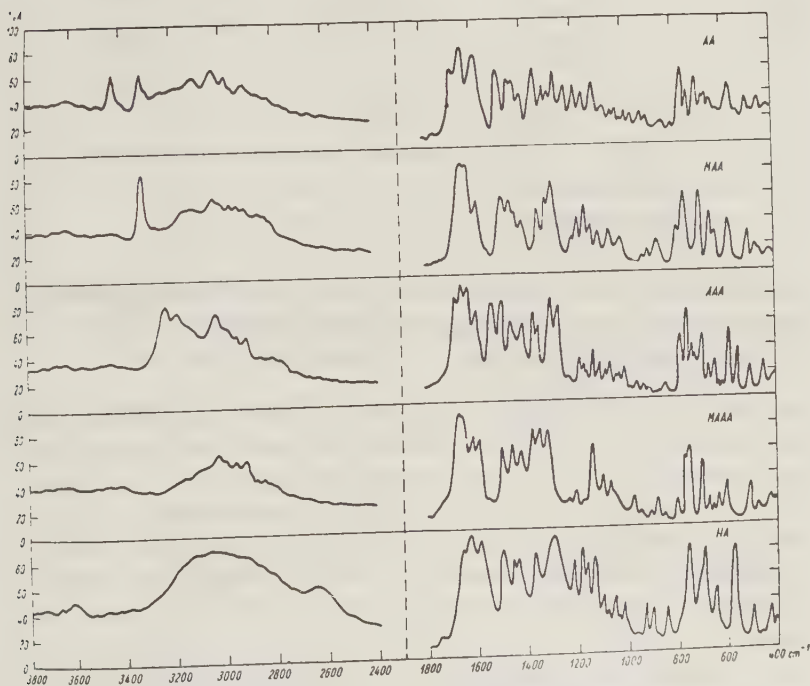
(Vecerkova und Mitarbeiter 1966a)

Hauptversuch:

Unter den in den Vorversuchen als günstig erkannten Voraussetzungen gelingt der papierchromatographische Nachweis des Aminophenazons und seiner obengenannten Metaboliten. Als Aminophenazon-Stoffwechselprodukte wurden dabei 4-Methylaminoantipyrin und Methylrubazonsäure erstmalig entdeckt und beschrieben.

Es werden Syntheseverfahren für die beschriebenen Stoffwechselprodukte angegeben. Desweiteren werden die IR-Spektren von AA, MAA, AAA, MAAA und HA veröffentlicht und zusammen mit den Absorptionsmaxima und molaren Extinktionskoeffizienten des UV-Bereichs kurz diskutiert.

Abb. 57



IR-Spektren der untersuchten Derivate (KB_r-Preßlinge)

Tab. 18

Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten

Stoffe	(nm)	$\log \epsilon$	A_1/A_2
AA	236	3,93	1,123
	256,5	3,97	
MAA	242	3,91	1,148
	263	3,97	
AAA	244	3,93	1,123
	266	3,97	
MAAA	244	3,91	1,148
	267	3,97	
HA	250	4,04	0,871
	270 (i)	3,98	

A_1 = Extinktionsmaximum bei 256 - 270 nm

A_2 = Extinktionsmaximum bei 236 - 250 nm

Zum Nachweis von Methylrubazonsäure und einer seiner eventuellen Vorstufen nach Gabe von Dimethylaminophenyl-dimethylpyrazolon beim Menschen (Preuß und Voigt 1965)

Bei papierchromatographischen Untersuchungen von Pyramidon-Harnextrakten fiel den Autoren ein bis dahin noch nicht beschriebener Farbstoff auf. (Fließmittel: Chloroform + Toluol = 10 + 45, angeschüttelt mit 15 Volumenteilen Wasser; Papier: Schleicher und Schüll 2043 b; keine Äquilibrierung, im übrigen ohne nähere Angaben). Die Isolierung und Identifizierung dieses Stoffwechselproduktes gelang auf folgendem Wege:

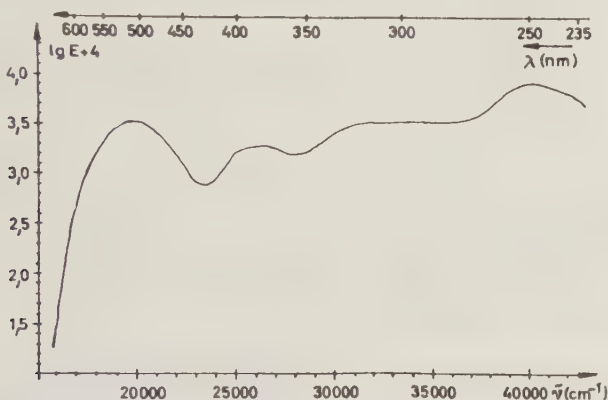
Durch Extraktion mit Methylenchlorid vorgereinigter Nativharn (pH 6,1) wurde mit HCl auf pH 2,5 - 3 gebracht und nochmals 12 Stunden lang perforiert.

Nach verschiedenen Reinigungsoperationen (Lösungsmittelwechsel, Säulenchromatographie an Kieselgel, Präparative Dünnschichtchromatographie) gewann man Kristalle.

IR-Spektrum und Schmelzpunkt dieser Kristalle und synthetisch hergestellter Methylrubazonsäure stimmten überein.

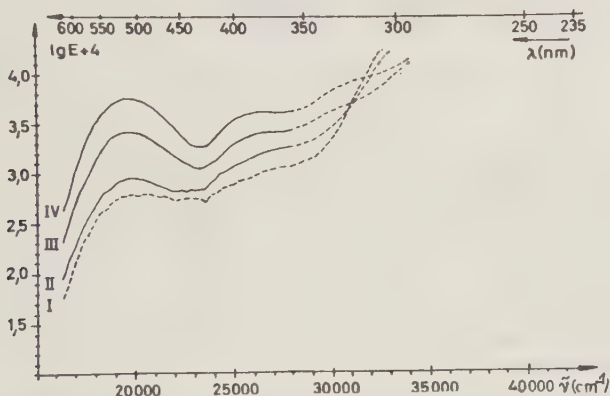
Weitere Untersuchungen zeigten, daß sich beim Stehenlassen von Pyramidonharn Methylrubazonsäure nachbildet. Als möglicherweise an dieser Reaktion beteiligte Substanz wiesen die Autoren das 1-Phenyl-3-methyl-4,5-diketopyrazolin als Oxim im Rubazonsäure- und Methylrubazonsäure-freien Pyramidonharn nach.

Abb. 68



UV-Absorptionskurve der Methylrubazonsäure in Methylenchlorid.

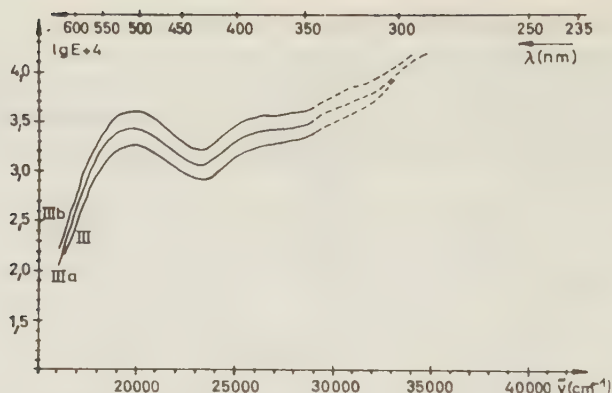
Abb. 69



UV-Absorptionskurven (I-IV) von Methylenchlorid-Auszügen aus Pyramidonharn nach steigendem Säreezusatz zum Harn

Lfd.Nr.	I	II	III	IV
pH	6,2	4,6	3,0	1,3

Abb. 70



UV-Absorptionskurve von Methylenchlorid-Auszügen aus Pyramidonharn vom pH 3,0 nach steigender Verweildauer des Methylenchlorids unter dem Harn. Entnahme und Messung nach 5 Tagen (Kurve III), 13 Tagen (Kurve IIIa) und 33 Tagen (Kurve IIIb). (nach Preuß und Voigt, 1965)

Quantitativer Nachweis von Aminopyrin und seinen Metaboliten 4-Amino-antipyrin, 4-Acetylamin-antipyrin, 4-Methylamin-antipyrin Rubazonsäure und Methylrubazonsäure im Harn mittels Dünnschichtchromatographie im Harn (nach Schüppel, 1965)

Zahl der Versuchspersonen: 1

Alter der Versuchsperson: 28 Jahre

Geschlecht: männlich

Dosierung: 3-5 Tage 1,0 - 1,5 g Aminopyrin täglich p.o.

Extraktion:

a) Materialien

Schwefelsäure 10 %

Natronlauge, N u. o, 1 N

Weinsäurelösung 10 %

Natriumsulfat, entwässert, frisch getrocknet

Calciumchlorid, gekörnt zum Trocknen

pH-Papier Merck

Ammoniaklösung, verd.

Äther DAB 6

Chloroform DAB 6.

b) Extraktion

Phase 1:

Nativ-Harn mit 10 %iger H_2SO_4 auf pH 1-2 bringen;

3-7 malige Extraktion mit 1/4 Vol. Äther.

Phase 1a (Probe auf Vollständigkeit der Extraktion):

nochmalige Extraktion wie unter Phase 1.

Phase 2:

Wässrigen Überstand des Systems 1a mit NaOH alkalisieren

erneutes Ansäuern mit Weinsäurelösung auf pH 4; 3-6malige

Extraktion mit 1/4 Vol $CHCl_3$.

Isolierung:

a) Methode: 2-dimensionale Dünnschichtchromatographie

b) Materialien:

Absorptionsmittel: Kieselgel G (Merck)

Fließmittel:

1 Cyclohexan-Aceton 40:50

2 Chloroform-Äthanol-Aceton 148,5:1,5:50

3 Chloroform-Äthanol 90:10

4 Chloroform-Äthanol 99:1

5 n-Butanol-Eisessig-Wasser 40:10:50

Detektion:

1 Natriumfluorescein

(unter Hg-Dampflampe bei 254 nm Fluoreszenz-
löschung auf hellem Untergrund)

2 4-Methylumbelliferon

3 Malonsäure-Salicylaldehyd

4 FeCl₃

5 Silbernitrat

6 Natriumbisulfit

7 Titan-3-chlorid

8 Ammon-sulfid-Lösung

9 Reagens auf (bestimmte) sekundäre Amine

aa) 1 %ige wässrige Lösung von Nitro-
prussidnatrium, der 10 % Acetaldehyd
zugesetzt werden.

bb) 2 %ige wässrige Sodalösung
(bei Bedarf aa) + bb))

10 p-Dimethylaminobenzaldehyd

11 Reagens auf 4-Aminoantipyrin

aa) 0,5 %ige wässrige Phenollösung und
5 %ige Ammoniaklösung werden zu gleichen
Teilen gemischt

bb) 2 %ige wässrige Lösung von Kaliumhexacyanoferrat III
(zuerst mit aa), dann mit bb) besprühen)

Identifikation:

a) Amidopyrin

Rf-Wert; Nr. des Fließmittels (s.o.) in ():

0,40 (1); 0,22 (2); 0,66 (3); 0,19 (5).

positive Farbreaktionen (Nr. der Färbung s.o.)

4 (blauviolett; wird bei weiterem Besprühen nach
einiger Zeit schwächer und verschwindet bei
geringer Konzentration bald).

Vergleichschromatogramm

b) 4-Aminoantipyrin

Rf-Werte; Nr. des Fließmittels (s.o.) in ():

0,13 (1); 0,10 (2); 0,36 (3); 0,39 (5).

positive Farbreaktionen (Nr. der Färbung s.o.)

11 (intensiv rot); 4 (rotviolett, nach Erhitzen

auf 80 °C: helles braun); 10 (gelb). Vergleichschromatogramm

c) 4-Acetylaminoantipyrin

Rf-Wert; Nr. des Fließmittels (s.o.) in ():

0,05 (1); 0,04 (2); 0,29 (3); 0,35 (5).

positive Farbreaktionen (Nr. der Färbung s.o.)

4 (nach Erhitzen auf 80 °C: helles Braun).

Vergleichschromatogramm

- d) 4-Methylaminoantipyrin
Rf-Wert: Nr. des Fließmittels (s.o.) in ():
0,22 (1); 0,17 (2); 0,49 (3); 0,30 (5).
positive Farbreaktionen (Nr. der Färbung s.o.)
zunächst farblos, färbt sich an der Luft nach
einigen Stunden hellbraun
4 (schwache Rotfärbung des Fleckenrandes mit
leichter Gelbfärbung des Fleckenzentrums;)
5 (rasche Schwarzfärbung)
9 (hellblau, verblaßt nach wenigen Minuten)
Vergleichschromatogramm
UV-Spektrogramm
- e) Rubazonsäure
Rf-Wert: Nr. des Fließmittels (s.o.) in ():
0,55 (1); 0,78 (2); 0,87 (3); 0,78 (5).
positive Farbreaktionen
nativ gefärbt;
Begasung mit Ammoniak: violett
Vergleichschromatogramm
- f) Methylrubazonsäure
Rf-Wert: Nr. des Fließmittels (s.o.) in ():
0,54 (1); 0,61 (2); 0,80 (3); 0,22 (4); 0,65 (5).
positive Farbreaktionen (Nr. der Färbung s.o.)
nativ tiefrot;
nach Besprühung mit 6, 7 oder 8 Umschlag in gelb
Vergleichschromatogramm
UV-Spektrogramm

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Dimethylamino-phenazon, Methylaminophenazon, 4-Aminophenazon, Acetylaminophenazon, Rubazonsäure und Methylrubazonsäure im Pyramidonharn beim Menschen

(Pechtold 1964 a, 1964b)

Zahl der VP: 1

Dosierung: 1 mal 0,6 g Pyramidon peroral

Nachweis im 8 Stunden nach Einnahme ausgeschiedenen Harn.

Extraktion:

1) saure Ausschüttelung

Harn ohne vorausgehende Bleiacetatfällung mit Essigsäure angesäuert, mit Kochsalz gesättigt und zweimal mit einer Mischung aus gleichen Teilen Methylenchlorid und Äther ausgeschüttelt. Erleichterte Phasentrennung durch Zugabe einiger ml Äthanol

2) Alkalische Ausschüttelung

Im Anschluß an saure Ausschüttelung Harn mit Natriumbicarbonat alkalisiert und Ausschüttelung wie unter 1) beschrieben wiederholt.

Extrakte über Natriumsulfat getrocknet und nach Einengung zur Dünnschichtchromatographie verwendet.

Isolierung:

Methode: Dünnschichtchromatographie; Kieselgel G (Merck)

Fließmittel:

Laufmittel I: Chloroform-Äther-Methanol 70:30:10

Laufmittel II: mit Äthanol stabilisiertes Narkose-chloroform

Färbungsmittel: (als Sprühreagentien)

R₁: Eisen(III)-chloridlösung DAB 6; 1:5 mit Wasser verdünnt

R₂: Vanadinschwefelsäure DAB 6

R₃: 0,5 %ige wäßrige Echtblausalz-B-Lösung

Identifizierung:

Färbung siehe Tabelle 19

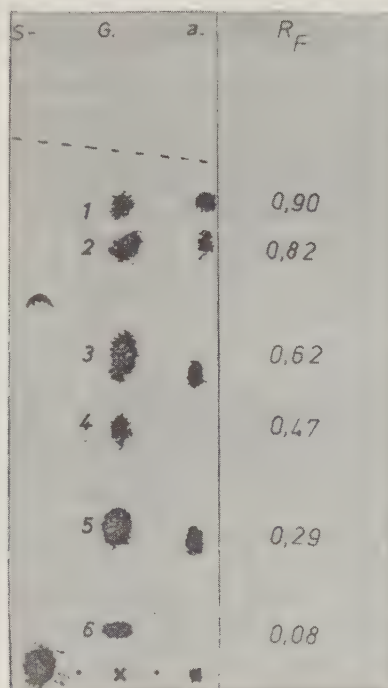
Tabelle 19 Farbreaktionen einiger Aminopyrin-Metaboliten

Substanz	R ₁	R ₂	R ₃
Dimethylaminophenazon	vorübergehend violett	vorübergehend blau	rotbraun
Methylaminophenazon	rot	zunächst keine Reaktion später rosa	gelb später rotbraun
4-Aminophenazon	rot	rot	rot später schwarz-violett
Hydroxyaminophenazon	keine Reaktion	keine Reaktion	braun später hellrot
Acetylaminophenazon	braun	keine Reaktion	keine Reaktion
Acetylmethylamino-phenazon	wie Acetylaminophenazon		
1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-ureido-pyrazolon (5)	bräunlich-violett	keine Reaktion	keine Reaktion

(Pechtold, 1964 a)

Mit dieser Methode gelang es Pechtold die oben angegebenen Metaboliten zu isolieren und nachzuweisen (Abb. 71).

Abb. 71 Dünnschichtchromatographie (Aminophenazon und seine Metaboliten)



Laufmittel I.

s = saure Ausschüttelung,
a = alkalische Ausschüttelung,
G = Testgemisch

1 = Dimethylaminophenazon

2 = Methylaminophenazon

3 = Aminophenazon

4 = Acetylmethylaminophenazon

5 = Acetylaminophenazon

6 = 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-ureidopyrazolon (5)

((Pechtold, 1964a))

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Aminopyrin, Methylaminophenazon, Aminophenazon, Acetylaminophenazon und einem bisher noch nicht beschriebenen Metaboliten, dem 4-Acetyl-amino-3-methyl-1-phenyl pyrazolon 5 im alkalischen Extrakt von Pyramidonharn.

(Klug 1970)

Harn von Säuglingen, Kleinkindern und Erwachsenen, denen therapeutische Dosen Pyramidon verabreicht worden waren, wurde in 8-Stunden Portionen gesammelt. Je 50 ml dieser Proben wurden mit Chloroform bei pH 9 extrahiert, die daraus erhaltenen Rückstände dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel GF 254 getrennt.

Tab. 20 Rf-Werte:

Rf-Werte x 100 des Amidopyrin und seiner Abbauprodukte in den benutzten Systemen nach einmaliger Entwicklung.
S y s t e m 1: Chloroform/Äther/Methanol (7:3:1);
S y s t e m 2: Chloroform/Benzol/Diäthylamin (6:12:2);
S y s t e m 3: Chloroform/Diäthylamin (9:1).

	System 1	System 2	System 3
Amidopyrin	91	66	84
Methylamino-phenazon	62	52	75
Aminophenazon	38	26	54
Acetyl-amino-phenazon	24	15	35
Neuer Metabolit	24	7	23

Detektionsmethoden:

- 1) nach intensivem Lüften der Platten Detektion von Aminopyrin, Methylaminophenazon und Aminophenazon im kurzwelligen UV-Licht und durch Besprühen mit Dragendorff's Reagens. (modifiziert nach Jatzkewitz, H., Z.physiol.Chem 292:94 (1953)).
- 2) Sichtbarmachen von Acetylaminophenazon und 4-Acetyl-amino-3-methyl-1-phenyl pyrazolon 5 durch Besprühen mit einer 10 %igen wäßrigen Eisen (III)-chloridlösung.

Zur besseren Trennung von Acetylaminophenazon und dem neuen Metaboliten wird eine Mehrfachtrennung empfohlen.

In einem Literaturüberblick (Tab. 21) ist die große Zahl der Metaboliten und Nachweismethoden zusammengestellt.

Literaturnachweis für die bisher isolierten Aminopyrin-

metaboliten

Tab. 21

Spalte	Extraktion aus		Isolierung			Identifizierung					
	Harn	Blut und Organen	Dünnschicht- chromatographie	Papier- chromatographie	Sonstige	Dünnschicht- matogr. Vergleich	Papierchromatogr. Vergleich	Kupplungs- und Farbreaktionen *	UV-Absorptions- spektrum	IR-Spektren	Elementar- analyse
Methylamino- antipyrin	5, 7 9		5 9	7		5 9	7	9(3) 7(8)	8 7,9	8	
Methylacetyl- amino-anti- pyrin	7			7			7	7(3)	8	8	
Amino-anti- pyrin	1, 3 5, 7 9	1	5 9	7	1 3	9	7	3(1) 5(3) 7(7) 9(3)	1 8	8	
Acetylamino- antipyrin	1, 3 5, 7 9	1	5 9	7	1 3	5 9	7	5(1) 7(4) 9(2)	1 8	8	3
Rubazonsäure	3, 7 9		9	7	3	9	7	7(3) 9(1)			3
Methyl- rubazonsäure	4, 5, 7, 9		5 9	7		9	7	7(6) 9(4)	4,7 9		
Hydroxy-anti- pyrinkonjugat	2, 3 7	2		7	2 3		7	7(3)	2 8	8	
PMRP ⁺	4		4						4	4	4
Antipyrin- harnstoff	3				3						
N ₂ AAA +	10	10				10		10(1)			
3-HM-Amp. ⁺⁺⁺	11	11				11		11(2)	11		
3-CS-Amp. ⁺⁺⁺⁺	11	11				11		11(2)	11		

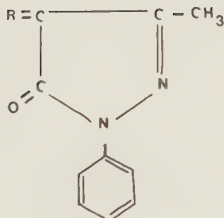
Zeichenerklärung s. S. 120 und 121

Zeichenerklärung zu Tab. 21:

Die Zahlen in der Tabelle entsprechen folgenden experimentellen Studien

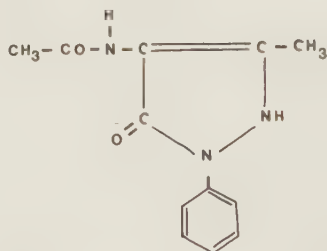
- 1 Brodie, 1950 a
- 2 Brodie, 1950 b
- 3 Halberkann, 1950
- 4 Preuß, 1965
- 5 Pechtold, 1964 b
- 6 Pechtold, 1964 c
- 7 Vecerkova, 1967b
- 8 Vecerkova, 1966a
- 9 Schüppel, 1965
- 10 Klug, 1970
- 11 Yoshimura, 1970

+



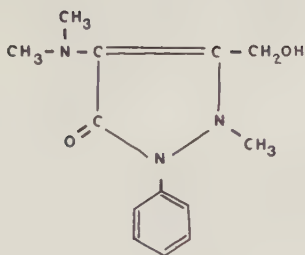
als Oxim nachgewiesenes
1-Phenyl-3-methyl-4-keto-
pyrazolon-(5)

++



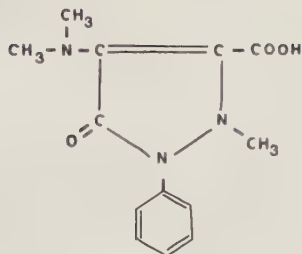
4-Acetyl-amino-3-methyl-
1-phenyl-pyrazolon-(5)

+++



"3-Hydroxymethyl-aminopyrin"

++++



"Aminopyrin-3-carboxylsäure"

- *) Die Zahl in Klammern gibt an, wieviele positive Färbe- und Kupplungsreaktionen beschrieben werden.

Quantitative

Bestimmung von Antipyrin in biologischem Material

(Brodie, 1949)

Methode 1 (Bestimmung in biologischen Flüssigkeiten und Geweben).

Materialien:

- 1) Standard-Antipyrin-Lösung, 100 mg/l.
100 mg Antipyrin werden in etwas Wasser gelöst, die Lösung auf 1 l aufgefüllt; Arbeits-Standard-Lösungen werden hergestellt, indem die Ausgangslösung mit 0,07 N H_2SO_4 aufgefüllt wird.
- 2) Chloroform
- 3) 1 N NaOH
- 4) 0,07 N H_2SO_4
- 5) 0,2 %iges NaNO_2
- 6) 1N HCl

Verfahrensweise:

- 1) Zur Probe (Faeces oder homogenisiertes Gewebe) werden 20 ml konzentrierte HCl zugegeben.
- 2) 1-5 ml des derartig vorbereiteten Materials werden mit 0,5 ml 1 N NaOH versetzt und mit 20 ml Chloroform 10 Minuten unter Schütteln (Schüttelapparat) extrahiert.
- 3) Beide Phasen werden gemeinsam zentrifugiert, die wässrige Phase dann durch Absaugen entfernt.
- 4) 15 ml des Lösungsmittels werden entnommen, das Chloroform dieser Probe bei Raumtemperatur im Luftstrom verdampft.
- 5) Der Rückstand wird in 4 ml 0,07 N H_2SO_4 aufgenommen und die Extinktion der Lösung in einem UV-Spektrometer bei 350 nm bestimmt. Mit 0,07 N H_2SO_4 wird eine Nullwertbestimmung durchgeführt.
- 6) Es werden 2 Tropfen der NaNO_2 -Lösung zu beiden Proben (der unbekannten und der Nullwertbestimmungssprobe) zugegeben und die optischen Dichten nach 20 Minuten nochmals abgelesen. Die unter 5) erhaltenen Werte werden von den nun gefundenen subtrahiert und anhand einer Eichkurve ausgewertet.

Antipyrinfreies Plasma, Urin oder Gewebe, die dieses Bestimmungsverfahren durchlaufen, ergeben vernachlässigbare Blindwerte.

Methode 2 (Bestimmung im Blutplasma)

Materialien:

- 1) Zink-Reagens (100 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 40 ml 6 N H_2SO_4 werden in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt)
- 2) 0,75 N NaOH
- 3) 4 N H_2SO_4
- 4) 0,2 %ige NaNO_2 -Lösung

Verfahrensweise:

- 1) In einen Erlenmeyerkolben werden je 2 ml Plasma, Zink-Reagens und Wasser gegeben.
- 2) Der Flascheninhalt wird in Drehbewegung versetzt und es werden tropfenweise 2 ml 0,75 N NaOH zugegeben, anschließend wird noch zusätzlich eine halbe Minute geschüttelt.
- 3) Nach 10 Min. bei 3500 Upm 15 Min. zentrifugieren.
- 4) Zu 3 ml der überstehenden klaren Flüssigkeit wird ein Tropfen 4 N H_2SO_4 zugegeben und die Extinktion der Lösung bei 350 nm bestimmt. Zur Bestimmung des Nullwertes wird eine entsprechende Messung der optischen Dichte von 3 ml Wasser und einem Tropfen 4 N H_2SO_4 durchgeführt.
- 5) Zu beiden Proben werden 2 Tropfen der 0,2 %igen NaNO_2 -Lösung zugegeben und 20 min. später ihre Extinktion bestimmt.
- 6) Von diesen Extinktionen werden die entsprechenden Werte vor der Zugabe von NaNO_2 subtrahiert und anhand einer Eichkurve ausgewertet.
- 7) Antipyrinfreies Plasma ergibt bei diesem Verfahren einen Blindwert von 0 - 2 $\mu\text{g/ml}$.

Eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ Antipyrin ergibt eine optische Dichte von ca. 0,350. Bei allen Untersuchungen müssen Standardproben mitbestimmt werden, da das Verfahren eine tägliche Streubreite der optischen Dichte von ca. 3 % zeigt.

Die Genauigkeit der Bestimmungsmethode geht auch aus der folgenden Tabelle 22 hervor.

Tab. 22 Ergebnisse

quantitative Bestimmung von dem Plasma zugeseztem Antipyrin					
Extraktionsmethode 1			Extraktionsmethode 2		
zugefügtes Antipyrin	wieder- gefunde- nes Antipyrin		zugefügtes Antipyrin	wieder- gefunde- nes Antipyrin	
μg	μg	%	μg^+	μg^+	%
10	10.3	103	12.5	12.3	98
	11.0	110		12.0	96
	10.1	101		20.0	100
	10.3	103		19.8	99
20	19.6	98	40	19.8	99
	19.8	99		20.0	100
	19.8	99		19.8	99
	19.8	99		20.0	100
	20.0	100		38.8	97
	20.0	100		39.6	99
30	29.1	97	40.8	39.6	99
	27.9	93		40.8	102
50	52.0	104	39.0	39.0	98
	51.0	102			
	48.0	96			
	48.0	96			
+ μg pro ml Plasma			(Brodie, 1949)		

Spezifität der Methoden:

Nach peroraler Antipyringabe wurden dem angegebenen Verfahren entsprechend Plasmaextraktrückstände gewonnen (Methode 1). Diese zeigen zwischen Chloroform oder Benzol einerseits und Wasser von verschiedenen pH andererseits ein nahezu identisches Verteilungsverhältnis wie authentisches Antipyrin:

Lösungsmittel	pH	Authentisches Antipyrin	Plasmaex- traktions- Rückstand
Aethylendichlorid	7	0,94	0,97
Aethylendichlorid	1(0.1 N HCl)	0,72	0,73
Benzol	7	0,81	0,79
Benzol	3	0,61	0,58
Benzol	1(0.1 N HCl)	0,35	0,36

(Brodie, 1949)

Die Autoren schließen daraus, daß das im Plasma bestimmte Material tatsächlich Antipyrin ist, insbesondere daß keine Antipyrinmetaboliten das Ergebnis verfälschen.

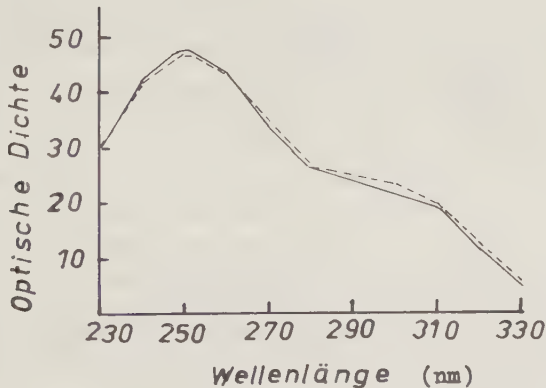
Quantitative, spektrophotometrische Bestimmung von 4-Hydroxyantipyrin und 4-Hydroxyantipyrinkonjugat in biologischem Material (Blutplasma oder Urin)

(Brodie, 1950)

Prinzip:

4-Hydroxyantipyrin wird aus dem biologischen Material bei pH 7-8 in Äthylendichlorid extrahiert. Zur Vervollständigung der Extraktion wird dabei die wäßrige Phase mit NaCl gesättigt. Im Anschluß daran wird die Verbindung wieder in ein alkalisches Milieu übergeführt. Sowohl diese, als auch das 4-Hydroxyantipyrinfreie biologische Material, das mit extrahiert wurde, werden spektrophotometrisch bei 270 nm gemessen.

Abb. 72



Absorptionsspektren von synthetischem (gestrichelte Linie) und aus Plasma isoliertem (durchgehende Linie) 4-Hydroxyantipyrin. Die Substanzen waren in 0,1 N NaOH gelöst. Konzentration: 10 microgramm/ml; Schichtdicke: 1 cm.

Obgleich das Absorptionsmaximum der Verbindung bei 250 nm liegt, wird die Extinktion bei 270 nm bestimmt, um die UV-Absorption des normalen biologischen Materials bei der Messung möglichst gering zu halten.

4-Hydroxyantipyrin erweist sich in alkalischer Lösung als nicht stabil. Es zersetzt sich bei Raumtemperatur innerhalb von 24 Stunden zu Produkten, deren Absorption bei 270 nm dann ungefähr 90 % niedriger liegt. Die Absorption des mitextrahierten, 4-Hydroxyantipyrin-freien Materials ändert sich während dieser Zeit nicht. Eine nochmalige Extinktionsbestimmung nach 24 Stunden ermöglicht daher, den Blindwertanteil des biologischen Materials an der Gesamtextinktion abzuschätzen.

Verfahrensweise für 4-Hydroxyantipyrin:

1-5 ml Plasma oder Urin (die bis zu 200 microgramm 4-Hydroxyantipyrin enthalten dürfen) werden auf pH 7-8 eingestellt und zusammen mit 2,5 g NaCl und 20 ml Äthylen-dichlorid fünf Minuten lang geschüttelt. Anschließend wird zentrifugiert und die wäßrige Phase dann durch Absaugen entfernt. 15 ml der organischen Phase und 5 ml 0,1 N NaOH werden zwei Minuten lang geschüttelt, im Anschluß daran sofort zwei Minuten zentrifugiert. Wiederum ohne Verzögerung wird dann die optische Dichte der wäßrigen Phase bei 270 nm bestimmt. Die Extinktionsmessung der Lösung wird nach 24 Stunden wiederholt.

Die 4-Hydroxyantipyrinkonzentration der Lösung kann nach folgender Formel bestimmt werden:

$$C_u = \frac{(U_a - U_b)}{(S_a - S_b)} \times C_s$$

C_u = unbekannte Antipyrinkonzentration

C_s = Konzentration einer Standardlösung

U_a = initiale Extinktion der untersuchten Lösung

U_b = Extinktion der untersuchten Lösung nach 24 Stunden

S_a = initiale Extinktion der Standardlösung

S_b = Extinktion der Standardlösung nach 24 Stunden

Da 4-Hydroxyantipyrinlösungen unbeständig sind, müssen Standardlösungen frisch hergestellt werden.

Dabei werden 10 mg der Verbindung in 100 ml Wasser gelöst, 1 ml dieser Standardlösung werden mit 0,1 N NaOH auf 5 ml aufgefüllt. Die Extinktionsbestimmung sollte dann

innerhalb 10 Minuten durchgeführt werden. Der Nullwert wird mit 0,1 N NaOH bestimmt. Die optische Dichte erwies sich als proportional zur Konzentration. 20 microgramm 4-Hydroxyantipyrin zeigten eine Extinktion von ungefähr 0,110. 10-200 microgramm dem Plasma oder Urin zugesetzte Mengen 4-Hydroxyantipyrin wurden zu 95 ($\pm$ 5) % wiedergefunden.

Verfahrensweise für 4-Hydroxyantipyrinkonjugat:

1-5 ml Plasma oder Urin (Gehalt an 4-Hydroxyantipyrin 100 - 500 microgramm) werden zusammen mit 1 ml konzentrierter HCl in einem verschlossenen Gefäß 45 Minuten im kochenden Wasser erhitzt. Dann wird der Inhalt in eine große verschließbare Flasche gegeben, das leere Gefäß dreimal mit 0,5 ml Wasser gespült, das Spülwasser sowie 5 g K_2HPO_4 und 20 ml Äthylendichlorid werden der erhitzten Flüssigkeit zugesetzt. Nach fünf Minuten Schütteln wird der Flascheninhalt zentrifugiert, im Anschluß daran die wäßrige Phase durch Absaugen entfernt. Die organische Phase wird zusammen mit 5 ml NaCl-gesättigtem M/15 Phosphatpuffer (pH 7) 1 Minute geschüttelt, dann die wäßrige Phase entfernt. Das Auswaschen wird einmal wiederholt. Dann werden 15 ml der organischen Phase mit 5 ml 0,1 N NaOH zusammengegeben und in der Bestimmung so fortgefahren, wie oben für 4-Hydroxyantipyrin besprochen.

Standardproben werden hergestellt indem 1 ml einer Standardlösung (250 - 500 microgramm) mit 2 ml antipyrinfreiem Urin oder Plasma zusammengegeben werden. Sie werden in der gleichen Weise bestimmt wie die unbekannten Proben.

Bei jeder Bestimmung sollen Standardproben das Verfahren mit durchlaufen, so daß bei der Berechnung berücksichtigt werden kann, daß die Verbindung im Verlauf der Hydrolyse in gewissem Umfang zerstört wird. Die Zerstörung der Verbindung während der Hydrolyse erklärt auch die Tatsache, daß die Bestimmung von Antipyrinmengen geringer als 100 microgramm weniger genau ist.

In ähnlicher Weise wie schon für Antipyrin beschrieben, wurde auch nachgewiesen, daß die hier beschriebene Methode für 4-Hydroxyantipyrin spezifisch ist, insbesondere keine Metaboliten mitbestimmt werden.

Zum dünnschichtchromatographischen Nachweis von Antipyrin, 4-Hydroxyantipyrin und 3-Hydroxymethyl-2-methyl-1-phenyl-3pyrazolin-5-on nach Antipyrin-Gabe im Harn von Mensch (und Tier).

(Yoshimura, 1968)

Dosierung: 1 mal 0,3 g Antipyrin peroral

Extraktion:

Nach Verabreichung des Antipyrin wurde Urin 8 Stunden lang gesammelt und dann 9 Stunden fortlaufend bei pH 6,6 mit CHCl_3 extrahiert: (Fraktion A) Im Anschluß daran wurde 1/5 Vol konzentrierte HCl zugegeben und das Gemisch im kochenden Wasserbad 45 Minuten erhitzt, um konjugierte Metaboliten zu hydrolysieren. Der hydrolysierte Urin wurde dann nochmals 9 Stunden bei pH 6,6 mit Chloroform extrahiert. (Fraktion B). Die beiden Fraktionen (A und B) wurden mit Na_2SO_4 getrocknet, dann das Lösungsmittel verdampft. Vor der Antipyrin-Medikation gesammelter Urin diente als Negativ-Kontrolle.

Isolierung:

Methode: Dünnschichtchromatographie; Kieselgel G, Merck;

Lösungsmittelsystem: Benzol, Aethylacetat, Aethanol (4:5:1);

Färbungsmittel:

- 1) Dragendorff Reagens
- 2) FeCl_3
- 3) Ehrlich Reagens

Identifizierung:

Färbung:

Antipyrin und seine Metaboliten zeigen mit den oben angegebenen Färbungsmethoden folgende Farben:

mit 1) orange

mit 2) braun

mit 3) rot

Um die rote Farbe mit Ehrlichs Reagens sichtbar zu machen, ist es notwendig, leicht zu erhitzen.

4-Hydroxyantipyrin färbt sich nicht mit FeCl_3 oder Ehrlichs Reagens; jedoch mit Dragendorff.

Rf-Werte:

Antipyrin: 0,23

4-Hydroxyantipyrin: 0,45

3-Hydroxymethyl-2-methyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on: 0,12

Nachweis von 1-Phenyl-3-methylpyrazolon-5 und 1-Phenyl-3-methyl-4,5-dioxo-pyrazolin nach Antipyringabe im Harn von Mensch (und Tier).

(Schüppel, 1966; Wittemann und Schüppel, 1968)

Nachweis des N-Glukuronid des 1-Phenyl-3-methyl-pyrazolon-5: Der neu gefundene Anipyrinmetabolit ist mit basischem Bleiacetat fällbar, zeigt ausgeprägte Säurelabilität und wird durch β -Glucuronidase gespalten.

Identifiziert wurde er chemisch über die Derivate 1-Phenyl-3-methyl-4-isonitroso-pyrazolon-5 und Methylrubazonsäure, spektrophotometrisch sowie an einigen anderen Farbreaktionen (Ehrlichs Reagens, FeCl_3 , Berlinerblau-Probe), ferner durch vergleichende Dünnschichtchromatographie. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Umsetzung mit 4-Aminoantipyrin zur intensiv gefärbten Methylrubazonsäure.

Im übrigen ohne nähere Angaben.

Nachweis der gebundenen Form des 1-Phenyl-3-methyl-4,5-dioxo-pyrazolin:

Der neu gefundene Metabolit wird erst durch Hydrolyse mit Schwefelsäure (30 Vol-% Endkonz.) extrahierbar.

Nach der Hydrolyse kann er nun dünn-schichtchromatographisch isoliert werden: Heptan, CHCl_3 , Alkohol (5:5:1); Kieselgel

GF²⁵⁴.

H) Zusammenfassung und Diskussion

Die vorliegende Arbeit faßt die zur Pharmakokinetik von Phenylbutazon, Oxyphenbutazon, Aminopyrin und Antipyrin beim Menschen veröffentlichten Einzelbeobachtungen zusammen und ordnet sie in ihre Zusammenhänge ein.

1) Resorption

Die hier besprochenen Medikamente werden nach peroraler Applikation vollständig resorbiert.

Bei therapeutischer Dosierung (gilt auch im folgenden, sofern nicht ausdrücklich anders erwähnt) werden im Plasma maximale Konzentrationen beim

Antipyrin nach 1-3 Stunden

Aminopyrin nach 2-4 Stunden

Phenylbutazon nach 1-3 Stunden

und Oxyphenbutazon nach 4-8 Stunden erreicht.

Die Resorption von Oxyphenbutazon und Phenylbutazon erfolgt wahrscheinlich im oberen Dünndarmbereich.

Nach i.v.-Gabe von Phenylbutazon fanden sich erst nach 10 Stunden maximale Werte im Plasma.

2) Verteilung im Organismus

Medikamentkonzentrationen im Plasma bei therapeutischer Einzeldosierung: (Höchstwerte; Zur Änderung der Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Zeit siehe Kapitel Metabolismus und Ausscheidung).

Aminopyrin: ca. 10-15 mg/l

Antipyrin: 10-20 mg/l

Phenylbutazon/ca 90 mg/l

Oxyphenbutazon ca. 60 mg/l

Bei Plasmakonzentration dieser Größenordnung ist Aminopyrin zu 15 %, Antipyrin zu 0-10 %, Phenylbutazon und Oxyphenbutazon zu 98-99 % an Plasmaproteine gebunden. Die Bindung von Phenylbutazon erfolgt hauptsächlich an die Albumine und α -Globuline.

Oxyphenbutazon wird durch Methandrostenolon aus seiner Plasmaproteinbindung verdrängt. Daraus läßt sich die Hypothese ableiten, daß Oxyphenbutazon auch seinerseits entzündungshemmende Stoffe (Kortikoide) aus ihrer Bindung an Plasmaproteine freisetzt. Dadurch ließe sich seine thera-

peutische Wirksamkeit zumindest teilweise erklären. Endgültige Resultate, die diese Hypothese unterstützen würden, stehen jedoch noch aus.

Organwerte:

Aminopyrin: Im Tierversuch fanden sich 4 Stunden nach peroraler Verabreichung im Gewebewasser Aminopyrinkonzentrationen, die in ihrem Verhältnis zur Konzentration im Plasma zwischen 0,74 (Cerebrospinalflüssigkeit) und 1,28 (Leber) als Extremwerten lagen. Pyramidon verteilt sich also recht gleichmäßig im Körperwasser. Wegen seiner leicht basischen Eigenschaften muß jedoch mit seiner Sekretion in den Magensaft gerechnet werden.

Antipyrin: Es verteilt sich nach peroraler oder i.v.-Applikation nahezu gleichmäßig im gesamten Körperwasser. Es kann daher zur Bestimmung von Körperwasservolumina herangezogen werden.

Phenylbutazon: Die Bestimmung von Phenylbutazon in Organen ist methodisch schwierig. Die Untersuchungen weisen auf relativ niedrige Medikamentkonzentrationen in Milz und Gehirn, auf mehrfach höhere Werte in Leber, Nieren und Nebennieren hin. Eine besondere Organaffinität war jedoch nicht nachzuweisen.

Oxyphenbutazon: Systematische Untersuchungen über Oxyphenbutazonorganwerte stehen nicht zur Verfügung. Folgende Einzelbeobachtungen wurden gemacht: Beim Gesunden ist kein Oxyphenbutazon im Liquor nachweisbar; es wird in die Galle ausgeschieden und unterliegt dort möglicherweise einem enterohepatischen Kreislauf.

3) Elimination

Phenylbutazon: Das Medikament zeigt im Plasma eine Halbwertszeit von 72 Stunden. Da es bei therapeutischer Dosierung praktisch weder im Stuhl noch im Harn ausgeschieden wird, ist eine vollständige metabolische Transformation anzunehmen. Im Harn wurden bisher zwei Metaboliten nachgewiesen:

1-Phenyl-2-p-hydroxyphenyl-3,5-dioxo-4-n-butyl-pyrazolidin (Metabolit I) und 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-4-n-(β -hydroxybutyl)-pyrazolidin (Metabolit II).

Der Metabolit I ist identisch mit Oxyphenbutazon. Eingenommenes Phenylbutazon wird zu 3 % als Metabolit I, zu 5 % als Metabolit II ausgeschieden. Der Verbleib der restlichen 92 % ist bisher noch nicht geklärt.

Oxyphenbutazon: Nach jeweils 48-72 Stunden nimmt seine Konzentration im Plasma um 50 % ab. Nach peroraler Einnahme wird es zu 4 % unverändert im Harn wiedergefunden. Dünnschichtchromatographisch ließen sich im Harn nach Oxyphenbutazongabe 4 ihrer Struktur nach unbekannte Abbauprodukte nachweisen. Eine dieser Fraktionen muß eventuell aber auch als Artefakt angesehen werden (Autoxydation von Oxyphenbutazon zu 1-Phenyl-2-(p-hydroxyphenyl)-3,5-dioxo-4-hydroxy-4n-butyl-pyrazolidin bei Anwesenheit von Luftsauerstoff).

Aminopyrin: Seine Halbwertszeit im Plasma beträgt etwa 2 - 3 Stunden. Peroral verabreichtes Pyramidon wird höchstens in Spuren unverändert ausgeschieden. Dabei ließen sich auch folgende Metaboliten im Harn nachweisen:

Methylaminoantipyrin

Methylacetylaminoantipyrin

Aminoantipyrin (8 - 23 %)

Acetylaminoantipyrin (29 - 36 %)

1-Phenyl-3-methyl-4-acetylamino-pyrazolon-(5)

Hydroxyantipyringlukuronat

1-Phenyl-3-methyl-4-keto-pyrazolon-(5)

3-Hydroxymethylaminopyrin

Aminopyrin-3-formiat

Antipyrilharnstoff

Rubazonsäure

Methylrubazonsäure

(Die Zahlen in Klammern geben an, welchem Prozentsatz des eingenommenen Aminopyrin die gefundenen Metabolitmengen entsprechen).

Angriffspunkte für die metabolisch aktiven Enzyme sind demnach die Dimethylaminogruppe und die beiden N_2 - bzw. C_3 -gebundenen Methylgruppen. Bei therapeutischer Dosierung

wird eingenommenes Pyramidon zu ca. 50 - 60 % als Aminoantipyrin und Acetylaminoantipyrin ausgeschieden. Welchen Anteil die übrigen Metaboliten an der Gesamtstoffwechselbilanz haben, wurde bisher mengenmäßig noch nicht bestimmt. Im Blut finden sich nach Gabe von 0,5 g Aminopyrin innerhalb von 6 Stunden ein Acetylaminoantipyrinspiegel von ungefähr 5 mg/l im Plasma, der dann weitere 18 Stunden nahezu gleichblieb.

Während dieser Zeit waren nur Spuren von Aminoantipyrin nachzuweisen. Die Pyramidonkonzentration nahm währenddessen laufend ab. (Ausgangswert 12 mg/l) Es wurde also offensichtlich laufend Acetylaminoantipyrin nachgebildet, wobei sich zwischen seiner Neubildung und seiner Elimination nahezu ein Gleichgewicht einstellte. Weiter ist bemerkenswert, daß die Ausscheidung von Pyramidon zu seinen Metaboliten im Harn in einer direkten Abhängigkeit zu der zur Verfügung stehenden Harnmenge steht. Je mehr Harn, desto bessere Medikamentausscheidung.

Antipyrin: Das Medikament zeigt eine Halbwertszeit im Plasma von rund 10 Stunden. Es wird zu 0 - 5 % unverändert im Harn wiedergefunden. Folgende Antipyrinstoffwechselprodukte können ebenfalls aus dem Harn isoliert werden:

Hydroxyantipyrinkonjugat

Norphenazon-N-Glukuronid

3-Hydroxymethylphenazon

konjugiertes 1-Phenyl-3-methyl-4-keto-pyrazolon-(5)

Das in therapeutischer Dosierung eingenommene Antipyrin wird zu 20 - 40 % als konjugiertes Hydroxyantipyrin ausgeschieden. Der Anteil der übrigen Metaboliten an der Antipyrinstoffwechselbilanz wurde bisher mengenmäßig noch nicht bestimmt.

In einem Anhangsteil werden kurz die wichtigsten Verfahren angegeben, nach denen die Medikamente und ihre bisher bekannten Metaboliten in biologischem Material bestimmt werden können.

Es fällt auf, daß für die Pyrazolidine (Phenylbutazon und Oxyphenbutazon) nahezu ausschließlich spektrophotometrische Bestimmungsverfahren angegeben werden. Offensichtlich ist es bisher nicht gelungen, Methoden zu entwickeln, die in einfacher Weise eine quantitative Extraktion der Mittel aus dem biologischen Material ermöglichen, ohne daß mitextrahierte Verunreinigungen eine sich anschließende Chromatographische Auftrennung stark behindern.

I) LITERATURVERZEICHNIS

1. ARRIGONI, E.
Studio delle attivita metabolizzanti degli organi
"isolati in situ". -
1) Processi di demetilazione dell' aminopirina
nel fegato
Boll. soc. Ital. Biolog. sper. (Napoli) 43, 856 (1967)
- 1a. AUTERHOFF, H.
Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie
5., neubearbeitete Auflage, 1968
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH Stuttgart
2. BECKSTEAD, H.D.
Determination and thinlayer chromatography of Phenylbut-
azone in the presence of decomposition products.
J. Pharm. Sci. 57, 1952 (1968)
3. BENZI, G.
Cerebral drug metabolism investigated by isolated
perfused brain in situ.
J. pharm. sci. (Washington) 56, 1349 (1967)
4. BREUGELMANN, J.G.
Etude analytique de la Phenylbutazone.
J. Pharmacie Belg. 38, 309 (1966)
5. BRODIE, B.B., J. AXELROD, R. SOBERMANN, B.B. LEVY
The estimation of Antipyrine in biological materials.
J. Biol. Chem. 179, 25 (1949)
6. BRODIE, B.B., J. AXELROD
The fate of Antipyrine in man.
J. Pharm. exp. Therap. 98, 97 (1950a)

7. BRODIE, B.B., J. AXELROD
The fate of Aminopyrine (Pyramidon) in man and methods for the estimation of Aminopyrine and its metabolites in biological material.
J. Pharm. exp. Therap. 99, 171 (1950b)
8. BRODIE, B.B.
Physicochemical and biochemical aspects of pharmacology.
J. A. M. A. 802, 600 (1967)
9. BURNS, J.J.
The physiological disposition of Phenylbutazone (Butazolidin) in man and a method for its estimation in biological material.
J. Pharm. exp. Therap. 109, 346 (1953)
10. BURNS, J.J.
The metabolic fate of Phenylbutazone (Butazolidin) in man.
J. Pharm. exp. Therap. 113, 481 (1955)
11. BURNS, J.J., T.F. YÜ, P.G. DAYTON, A.B. GUTMAN, B.B. BRODIE
Biochemical pharmacological considerations of Phenylbutazone and its analogues.
Ann. New York Acad. Sci. 86, 253 (1960)
12. BURNS, J.J.
Variation of drug metabolism in animals and the prediction of drug action in man.
Ann. New York Acad. Sci. 94, 959 (1968)

13. DENGLE, H.J.
Das Schicksal des Arzneimittels im Organismus.
Monatskurse ärztliche Fortbildung 10, 503 (1966)
14. FINGER, K., L. ZICHA
Dünnschichtchromatographische Untersuchungen
über Oxyphenbutazon in Körperflüssigkeiten.
Med. Pharm. Exp. 13 161 (1965)
15. FUCHS, W.
Blutspiegelbestimmung von Butazolidin und Tanderil aus einem Tropfen Kapillarblut.
Münch. Med. Wschr. 25, 1267 (1965)
16. GILLETTE, J.R.
Biochemistry of drug oxidation and reduction
by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum.
Adv. pharmac. 4, 219 (1966)
17. GSELL, O., W. MÜLLER
Parenterale Pyramidon-Pyrazolidin-Therapie von
Rheumatismus und Infekten mittels Irgapyrin.
Schweiz. med. Wschr. 80, 310 (1950)
18. HAYS, I.M., K. MACEK
Handbuch der Papierchromatographie.
2. Auflage
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1963
19. HALBERKANN, J., F. FRETWURST
Die Stoffwechselprodukte des Pyramidon und
verwandter Verbindungen beim Menschen.
Zschr. Physiol. Chem. 285, 97 (1950)

20. HARWERTH, H.G., E. WÖHLER
Untersuchungen über die Beziehungen zwischen
Butazolidin und Serumeiweißkörpern.
Proceedings III European Rheumatology Congress
Elsevier, The Hague 1956, 613

21. HARWERTH, H.G., E. WÖHLER
Neuere Ergebnisse über Verteilung, Verhalten
und Stoffwechselwirkungen von Butazolidin.
Z. Rheumaforsch. 16, 265 (1957)

22. HERRMANN, B.
Über den Stoffwechsel des Butazolidin.
Med. Experiment. 1, 170 (1960)

23. HILDEBRANDT, A., R. ESTABROOK
Evidence for the participation of cytochrome
b₅ in hepatic microsomal Mixed-Function ox-
idation reactions.
Arch. Biochem. Biophys. 143, 66 (1971)

24. HVIDBERG, E.F., P.G. DAYTON, J.M. READ III,
C.H. WILSON
Studies of the interaction of Phenylbutazone,
Oxyphenbutazone and Methandrostenolone in man.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 129, 438 (1968)

25. JAFFE, M.
Über den nach Pyramidongebrauch im Harn auf-
tretendem roten Farbstoff.
Ber. dtsh. Chem. Ges. 34, 2737 (1901)

26. JAFFE, M.
Antipyrilharnstoff, ein Stoffwechselderivat
des Pyrimidons.
Ber. dtsch. Chem. Ges. 35, 2891 (1902)
27. JAKOB, R.
Klinisch-chemische Untersuchungen mit Oxyphen-
butazon.
Zentralbl. Phlebol. 7, 162 (1968)
28. KARLSON, P.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
6. Neubearb. Auflage 1967
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
29. KATO, R.
Possible role of P-450 in the oxydation
of drugs in liver microsomes.
J. Biochem. 59, 574 (1966)
30. KLINGER, W.
Untersuchungen zum Mechanismus der Enzyminduktion XV
Induktionsmuster und submikroskopische Veränderun-
gen in der Leber nach Applikation von Phenylbut-
azon bei unterschiedlich alten Ratten.
Acta biol. med. germ. 24, 463 (1970)
31. KLUG, E.
Über einen neuen Metaboliten des Dimethylamino-
phenyl-dimethylpyrazolon.
Arzneimittelforschung 20, 201 (1970)

32. KNORR, L.
Einwirkung von Acetessigester auf Hydrazin-
chinizinderivate.
Ber. dtsch. Chem. Ges. 17, 546 (1884)
33. LA DU, B., L. GANDETTE, N. TRONSOF, B.B. BRODIE
Enzymatic dealkylation of Aminopyrine
(Pyramidon) and other alkylamines.
J. biol. Chem. 214, 741 (1955)
34. LAWROW, D.
Über die Ausscheidung des Antipyrins aus dem
tierischen Organismus.
Z. physiol. Chem. 32, 114 (1901)
35. LEVI, A.J.
Phenylbutazone and Isoniazid metabolism in
patients with liver disease in relation
to previous drug therapy.
Lancet 1968, 1275
- 35a. LEYBOLD, K.
Hydroxylierung von Phenylbutazon und Imipramin
durch Kaninchenlebermikrosomen.
Z. Ges. Exp. Med. 136, 78 (1962)
36. MAGGIORELLI, E.
Determinazione colorimetrica del Fenilbutazone.
Boll. Chim. Farm. 105, 893 (1966)
37. NEGWER, M.
Organisch-chemische Arzneimittel und ihre
Synonyma (eine tabellarische Übersicht)
3. Auflage (1967)
Akademie Verlag, Berlin

38. O'MALLEY K., I.H. STEVENSON, W. ALEXANDER
Increased Antipyrine half-life in women
taking oral contraceptiva.
Scot. Med. J. 15, 454 (1970)
39. O'MALLEY, K.
Drug metabolism in a geriatric population.
Clin. Sci. 41, 6 P (1971)
40. PECHTOLD, F.
Untersuchungen über den oxydativen Abbau
von Derivaten des 4-Aminophenazons.
Arzneimittelforschung 14, 258 (1964)
41. PECHTOLD, F.
Die Methylnubazonsäure als Oxydationsprodukt
von Derivaten des 4-Aminophenazons.
Arzneimittelforschung 14, 474 (1964)
42. PECHTOLD, F.
Zur Kenntnis des Abbaus von Dimethylamino-
phenyl-dimethylpyrazolon im Organismus.
Arzneimittelforschung 14, 972 (1964)
43. PEREL, J.M.
A study of structure-activity relationships
in regard to species difference in the
Phenylbutazone series.
Biochem. Pharmacol. 13, 1305 (1964)

44. PFISTER, R., F. HÄPLINGER
48. Über Derivate des Phenylbutazons.
I. In den Benzolkernen hydroxylierte Derivate.
Helv. Chem. Acta 40, 395 (1957)
45. PREUSS, Fr.R., K.M. VOIGT
Über die Vorstufen und die Bildung der Methyl-
rubazonsäure nach Einnahme von Amidopyrin.
Arzneimittelforschung 15, 741 (1965)
46. PULVER, R.
Über Irgapyrin, ein neues Antirheumaticum
und Analgeticum.
Schweiz. med. Wschr. 80, 308 (1950)
47. PULVER, R.
Über die Beeinflussung enzymatischer Reaktionen
durch Phenylbutazon und die Übertragbarkeit
fermentchemischer Befunde auf die Stoffwechsel-
prozesse der Zelle.
Schweiz. med. Wschr. 86, 1080 (1956)
48. RECHENBERG von, H.K., B. HERRMANN
Untersuchungen über die Resorption des Anti-
phlogisticums G 27202 (Tanderil^R)
Schweiz. med. Wschr. 13, 403 (1961)
49. RECHENBERG von, H.K.,
Butazolidin^R.
2. vollständig neu bearbeitete und
erweiterte Auflage 1961
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

50. SCHMITT, H.E., H.G. HARWERTH
Das Verhalten des Blutspiegels von 1-Phenyl-
2-(p-hydroxyphenyl)-3,5-dioxo-4n-butyl-pyra-
zolidin-monohydrat bei rectaler Applikation.
Arzneimittelforschung 14, 214 (1964)
51. SCHÜPPEL, R., K. SÖHRING
Qualitative Untersuchungen über den Amido-
pyrinstoffwechsel beim Menschen.
Pharmaceut. Acta Helv. 40, 105 (1965)
52. SCHÜPPEL, R.
Die Stickstoff-Demethylierung am Phenazon
(Antipyrin^R).
Arch. Pharm. exp. Path. 255, 71 (1966)
53. SHORE, A.P.
The gastric secretion of drugs:
A pH partition hypothesis.
J. Pharm. exp. Therap. 119, 361 (1957)
54. SOBERMANN, R.
The use of Antipyrine in the measurment of
total body water in man.
J. biol. Chem. 179, 31 (1949)
55. SÖDER, H.M.
Nebenwirkungen und Vergiftungen bei Einnahme
von Pyrazolderivaten.
Dissertation Erlangen 1973

56. SOLOMON, H.M.
The displacement of Phenylbutazon- ^{14}C and Warfarin- ^{14}C from human albumin by various drugs and fatty acids.
Biochem. Pharmacol. 17, 143 (1968)
57. STAJER, H.
Neue photometrische Methode zur Bestimmung von Phenylbutazon.
Pharmazie 25, 126 (1970)
58. STENZEL, H., A. STAUB, C. SIMON, W. BAUMANN
152. Zur Kenntnis der 3-Amino-Pyrazolone (-5).
Helv. Chim. Acta 33, 1183 (1950)
59. STEVENS, H.M.
Faster extraction of Phenylbutazone from blood and plasma.
Clinical Chemistry 16, 437 (1970)
60. TOPHOJ, E.A.
Blood-Phenylbutazone levels after treatment in low dosage.
Acta Med. Scand. 160, 197 (1958)
61. UEHLEKE, H.
Stoffwechsel und Wirkung von Arzneimitteln.
Forschung und Praxis 50, 2771 (1965)
62. VECERKOVA, J., B. KAKAČ, B. VEČEREK, K. KÁČL
Die Anwendung papierchromatographischer Methoden zum toxikologischen Nachweis von Arzneimitteln.
6. Mitteilung: papierchromatographische Studie über Metaboliten des Aminophenazon I
Pharmazie 21, 676 (1966)

63. VECERKOVA, J., B. VECEREK, K. KACL
Die Anwendung papierchromatographischer Methoden
zum toxikologischen Nachweis von Arzneimitteln.
7. Mitteilung: papierchromatographische Studie
über Metaboliten des Aminophenazon II
Pharmazie 21, 682 (1966)
64. VECERKOVA, J., B. KAKAC, B. VECEREK, M. LEDVINA
Die Anwendung papierchromatographischer Methoden
zum toxikologischen Nachweis von Arzneimitteln.
8. Mitteilung: Neue Erkenntnisse über den Abbau
des Aminophenazon.
Pharmazie 22, 30 (1967)
65. VESELL, E.S., J.G. PAGE
Genetic control of drug levels in man:
Phenylbutazone.
Science 159, 1479 (1968)
66. VESELL, E.S., J.G. PAGE
Genetic control of drug levels in man:
Antipyrine.
Science 161, 72 (1968)
67. VESELL, E.S., J.G. PAGE
Genetic control of the Phenobarbital-induced
shortening of plasma Antipyrine
68. WAGNER, K.
Zur Pharmakokinetik bei chronischen Hepato-
pathien. Untersuchungen am Modell des Amino-
phenazons.
Dtsch. Gesundheitswes. (Berlin) 24, 1109 (1970)

69. WALLACE, J.E.
Ultraviolet spectrophotometric determination
of Phenylbutazone in biologic specimens.
J. Pharmaceut. Sci. 57, 2053 (1968)
70. WEINER, M.
Effect of steroids on disposition of Oxyphen-
butazone in man.
Proc. soc. exp. biol. med. (New York) 124, 1170 (1967)
71. Whittaker, J.A., PRICE EVANS D.A.
Genetic control of Phenylbutazone metabolism
in man.
Brit. Med. J. 4, 323 (1970)
72. WILBRANDT, W.
Die biologische Halbwertszeit von Medikamenten,
ihre Ermittlung und Bedeutung.
Schweiz. med. Wschr. 94, 737 (1964)
73. WILHELM, G.
Newer pharmacological data on Oxyphenbutazone.
Jap. J. Pharmacol. 15, 187 (1965)
74. WITTEMAN, G., R. SCHÜPPEL
Nachweis eines neuen reaktionsfähigen Metaboli-
ten im Stoffwechsel von Phenazon (Antipyrin^R).
Arch. Pharm. exp. Path. 260, 219 (1968)
75. WÖHLER, F.
Über die Bindung von Chemotherapeutica an
Serumproteine.
4. Colloquium, St. Jans Hospital Brugge (1956) 172

76. WUNDERLY, Ch.
Die Bindung von Butazolidin an die Serum-
proteinfraction.
Proceedings III European Rheumatology Congress
Elsevier, The Hague, Scheveningen 1956, 616
77. WUNDERLY, Ch.
Die Proteinbindung von 3,5-Dioxo-1,2-diphenyl-
4n-butyl-pyrazolidin und weiterer Pharmaka.
Arzneimittelforschung 6, 731 (1956)
78. YOSHIMURA, H.
Metabolism of drugs.
LIX. A new metabolite of Antipyrine.
Biochem. Pharmacol. 17, 1511 (1968)
79. YOSHIMURA, H.
Metabolism of drugs.
LXXI. The study on Aminopyrine Metabolism.
J. Pharmaceut. Soc. Jap. (= Yakugaku Zasshi)
90, 1406 (1970)
80. YÜ, T.F.
Phenylbutazone metabolites: antirheumatic,
sodium retaining and uricosuric effects in man.
H. Pharmac. exp. Ther. 123, 63 (1958)
81. ZICHA, L., F. SCHEIFFARTH, E. SCHMID, O. TAUBER,
H. FINGER
Klinische und experimentelle Untersuchungen
über Phenylbutazon und Oxyphenbutazon.
Arzneimittelforschung 15, 921 (1965)

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Weinig, dem ehemaligen Leiter des Instituts für Rechtsmedizin danke ich sehr für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes, für Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und die Übernahme des Korreferates.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas und ihre zahlreichen und wertvollen Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Für die Fertigstellung der Zeichnungen möchte ich mich herzlich bei Herrn F. Gorzel und Herrn O. Opitz bedanken.

Am 5.10.1946 wurde ich als zweiter Sohn des Praktischen Arztes Dr. med. Bernhard Stelzer und seiner Ehefrau Dr. med. Helene Stelzer geb. Krings in Aachen geboren.

Meine Jugend verbrachte ich in Stolberg (Rhl.), wo mein Vater als Landarzt tätig war. Seit dessen Tod Anfang des Jahres 1973, führt meine Mutter die Praxis weiter.

Nach 4 Volksschuljahren (1953-1957) besuchte ich das Städtische Humanistische Gymnasium in Stolberg, an welchem ich nach 9 Jahren (1966) die Reifeprüfung bestand.

Ich entschloß mich, ebenfalls Medizin zu studieren und nahm im Sommersemester 1966 mein Studium in Erlangen auf. Im Wintersemester 1971/72 legte ich das Medizinische Staatsexamen ab.

Meine Medizinalassistentenzeit absolvierte ich in der Chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Heinsberg (Rhl.) sowie im Medizinischen Institut der Kernforschungsanlage Jülich.

Seit meiner Approbation im April 1973 bin ich als Truppenarzt der Bundeswehr in Seeth (Schleswig-Holstein) tätig.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990